

# Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Peptids: Einfluss von Fluorophoren, Aggregationskinetik und Thermostabilität der Aggregate

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II  
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

**Jana Josefine Wägele**

geboren am 03.06.1989 in Lüneburg

02. Juni 2023

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Thurn-Albrecht
2. Gutachterin: Dr. Maria Ott
3. Gutachter: Jun.-Prof. Dr. Wolfgang Hoyer

Datum der öffentlichen Verteidigung: 8. Januar 2024

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Jana Josefine Wägele, geb. Rüdell

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

## Bildungsweg

- Feb. 2015 - Jan. 2024      Promotion Physik  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Okt. 2012 - Dez. 2014:    M. Sc. Physik  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Okt. 2008 - Sep. 2012:    B. Sc. Physik  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
und Uppsala Universität, Schweden (Aug. 2010 – März 2011)
- Juni 2008:                    Allgemeine Hochschulreife



# Publikationen

- Jana Wägele, Silvia de Sio, Bruno Voigt, Jochen Balbach und Maria Ott:  
*How Fluorescent Tags Modify Oligomer Size Distributions of the Alzheimer Peptide*  
Biophysical Journal (2019) 116(2):217-238  
DOI: 10.1016/j.bpj.2018.12.010
- Silvia de Sio, Jana Wägele, Twinkle Bathia, Bruno Voigt, Hauke Lilie und Maria Ott:  
*Inherent Adaptivity of Alzheimer Peptides to Crowded Environments*  
Macromolecular Bioscience (2023) 2200527  
DOI: 10.1002/mabi.202200527



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2. Grundlagen: Aggregation von Amyloiden</b>	<b>7</b>
2.1. Proteinfaltung und Amyloidbildung	7
2.1.1. Faltung von Proteinen	7
2.1.2. Thermische Denaturierung	7
2.1.3. Entstehung von Amyloidfibrillen	8
2.1.4. Vom Peptid zur Fibrille: Bedeutung der Oligomere	8
2.2. Mechanismen der Amyloidaggregation	9
2.2.1. Klassische Keimbildungstheorie	11
2.2.2. Adaption für Proteine und Peptide bei Oosawa und Ferrone	12
2.2.3. Modelle zur Beschreibung der Aggregationskinetik des Amyloid- $\beta$ -Peptids	16
2.3. Das Amyloid- $\beta$ -Peptid	24
<b>3. Experimentelles</b>	<b>25</b>
3.1. Probenmaterial und Präparation von Aggregationslösungen	25
3.1.1. Verwendete A $\beta$ -Peptide	25
3.1.2. Herstellung von Aggregationslösungen	27
3.2. Fluoreszenzspektroskopie	27
3.2.1. Fluorophore und Fluoreszenzübergänge	28
3.2.2. Konfokale Mikroskopie	30
3.2.3. Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmikroskops	31
3.2.4. Fluoreszenz-Anisotropie	33
3.2.5. Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)	35
3.3. Entwicklung einer Burstanalyse für smFS-Messungen	37
3.3.1. Experimentelle Voraussetzungen und Datensätze	38
3.3.2. Selektion der Burst-Photonen	39
3.3.3. Quantitative Burst-Analyse	41
3.3.4. Darstellung von Oligomer-Verteilungen	43
3.4. Thioflavin T Assays	44
3.4.1. Fluoreszenzverhalten von Thioflavin T	44
3.4.2. Präparation der Lösungen für ThT Assays	45
3.4.3. Aufnahme von Fibrillierungskinetiken	46
3.4.4. Makroskopische Analyse von ThT Assays	46
3.4.5. Weiterführende Auswertung von ThT Assays	49
3.5. Schnelle Differentielle Kalorimetrie an Flüssigkeiten (LFDSC)	51
3.5.1. Konventionelle DSC und Flash DSC	51
3.5.2. Probenpräparation für (ultraschnelle) DSC-Messungen	52
3.6. Absorptionmessungen zur Konzentrationsbestimmung	53
3.7. Bildgebende Verfahren	54
3.7.1. Transmissionselektronenmikroskopie	54
3.7.2. Rasterkraftmikroskopie	54
3.7.3. Probenpräparation für TEM- und AFM-Messungen	55
3.8. Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	55
<b>4. Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von A<math>\beta</math>-Oligomeren</b>	<b>57</b>
4.1. Einleitung und Fragestellung	57
4.2. Nachweis der Fibrillierung von gelabeltem A $\beta$ 40	58

4.3.	Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren . . . . .	59
4.3.1.	Einfluss der Fluorophore auf die Größenverteilung der A $\beta$ 40-Oligomere . . .	59
4.3.2.	Interaktionen der verwendeten Fluorophore . . . . .	61
4.3.3.	Schlussfolgerungen für die Eignung als Label . . . . .	65
4.4.	Vergleich mit A $\beta$ 42 . . . . .	66
4.5.	Zusammenfassung . . . . .	68
<b>5.</b>	<b>Aggregationskinetiken und -mechanismen des Amyloid-<math>\beta</math>-Peptids</b>	<b>69</b>
5.1.	Einleitung und Fragestellung . . . . .	69
5.2.	Optimierung der Aggregationsbedingungen . . . . .	70
5.3.	Aggregationskinetik von A $\beta$ 40 . . . . .	74
5.4.	Aggregationskinetik der A $\beta$ 40-Varianten E22P und G37P . . . . .	80
5.4.1.	Aggregationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp . . . . .	81
5.5.	Analyse der Aggregationskinetiken im Bereich hoher und niedriger Konzentrationen	86
5.5.1.	Selbst-Inhibition und Off-Pathway-Oligomere als mögliche Mechanismen bei hohen A $\beta$ 40-Konzentrationen . . . . .	86
5.5.2.	Wandeffekte bei niedrigen A $\beta$ 40-Konzentrationen . . . . .	91
5.6.	Resultierendes Modell der A $\beta$ 40-Aggregation . . . . .	92
5.7.	Vergleich mit A $\beta$ 42 . . . . .	93
5.7.1.	Aggregationskinetik der verwendeten A $\beta$ 42-Varianten . . . . .	93
5.8.	Zusammenfassung und Fazit . . . . .	95
<b>6.</b>	<b>Flüssigkeits-FDSC-Untersuchungen der Thermostabilität des A<math>\beta</math>42-Peptids</b>	<b>97</b>
6.1.	Einleitung und Fragestellung . . . . .	97
6.2.	Etablierung und Charakterisierung von Flüssigkeitssensoren . . . . .	98
6.3.	Thermostabilität von A $\beta$ 42-Aggregaten . . . . .	104
6.4.	Zusammenfassung und Fazit . . . . .	107
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>109</b>
	<b>Literatur</b>	<b>115</b>
<b>A.</b>	<b>Ergänzung: Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren</b>	<b>127</b>
A.1.	ThT Assays an markierten A $\beta$ 40 Peptiden . . . . .	127
A.2.	Ergänzende TEM-Aufnahmen . . . . .	127
A.3.	Größenverteilung der A $\beta$ 42-Oligomere . . . . .	128
<b>B.</b>	<b>Ergänzung: Aggregationskinetik von A<math>\beta</math>40 und A<math>\beta</math>42</b>	<b>129</b>
B.1.	Bildung von gemittelten ThT Assays bei stark unterschiedlichen Lagzeiten . . . . .	129
B.2.	Posterpräsentation inklusive Inhibitionseffekt . . . . .	129
B.3.	Beispiele für die Fibrillierungskinetik der A $\beta$ 40-Varianten im Ensemble . . . . .	130
B.4.	Konzentrationsabhängigkeit makroskopischer Zeitgrößen . . . . .	131
B.5.	Plateauintensitäten der A $\beta$ 40-Varianten im Vergleich . . . . .	132
B.6.	ThT Assays an A $\beta$ 42E22P . . . . .	133
B.7.	Bestimmung der Elongationsrate mithilfe einer Thermophoretischen Falle . . . . .	133
B.7.1.	Analyse des Fibrillenwachstums in der Thermophoretischen Falle . . . . .	133
B.7.2.	Probenpräparation für die Thermophoretische Falle . . . . .	134
B.7.3.	Resultate für A $\beta$ -Varianten . . . . .	135
<b>C.</b>	<b>Angaben zu verwendeter Software zur Erstellung von Abbildungen</b>	<b>137</b>
<b>D.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>139</b>



# 1. Einleitung

Aggregationsprozesse lassen sich in vielen Kontexten beobachten: etwa bei der Bildung von Mineralien, bei der Entstehung von Zellkolonien, bei der Formation subsozialer temporärer Tiergesellschaften oder bei der Aggregation von Proteinen. Proteinaggregate lassen sich aufgrund ihrer strukturellen Merkmale in verschiedene Kategorien unterteilen: eine dieser Kategorien stellen Amyloide dar [1]. Als Amyloidfibrillen werden faserartige Aggregate aus mehreren hunderten bis tausenden Peptiden oder Proteinen bezeichnet, bei denen die einzelnen Moleküle eine aus dicht gepackten  $\beta$ -Strängen zusammengesetzte *cross*- $\beta$ -Struktur<sup>1</sup> formen [2]. Eine solche Struktur wurde erstmals bereits 1935 von *Astbury et al.* [3] für Hühnereiweiß beschrieben. Inzwischen konnte die Entstehung von Amyloidfibrillen als fundamentaler Prozess der Strukturbildung identifiziert werden: Es wird davon ausgegangen, dass alle Proteine prinzipiell Amyloide bilden können, wenn sie entsprechenden äußeren Bedingungen ausgesetzt werden [4].

Amyloide übernehmen diverse biologische Funktion: Sie steuern z.B. die Bildung bakterieller Biofilme, wirken als Speicher oder regulieren die Melaninproduktion [5]. Besonders prominent ist jedoch ihre Verknüpfung mit dem Auftreten bestimmter Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Diabetes Typ 2 [6]. Alzheimer verursacht 50-80 % aller weltweiten Demenzerkrankungen und betrifft etwa 0.5 % der Weltbevölkerung [7]. Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Alzheimer spielt das Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ), dessen Oligomere, kleine nicht-fibrilläre Intermediate der Aggregation, als neurotoxisch gelten [8, 9];  $A\beta$ -Fibrillen hingegen sind Hauptbestandteil seniler Plaques [10]. Das  $A\beta$ -Peptid entsteht körpereigen durch die Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP), wobei 39 bis 43 Aminosäuren lange Fragmente entstehen [11]. Die beiden häufigsten und wichtigsten Formen sind dabei  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$ <sup>2</sup> [12].

Diese Arbeit widmet sich drei verschiedenen Aspekten der Aggregation des  $A\beta$ -Peptids: Erstens dem Einfluss fluoreszierender Label auf die Bildung von Oligomeren, zweitens der Aggregationskinetik des  $A\beta$ -Peptids und zugrundeliegenden mikroskopischen Mechanismen und drittens der Thermostabilität von  $A\beta_{42}$ -Aggregaten.

## **Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren**

Aufgrund ihrer Toxizität und engen Verknüpfung mit dem Auftreten von Alzheimer rückte die Untersuchung von Oligomeren zuletzt zunehmend in den Fokus des Forschungsinteresses; da sie in der Regel nur temporär und in geringen Konzentrationen beobachtbar sind, werden dafür vor allem auf fluoreszenz-basierte optische Techniken wie Photobleichung oder Fluoreszenzkorrelationspektroskopie eingesetzt [13, 14, 15]. All diesen Techniken ist gemein, dass sie auf der Anregung von Fluorophoren und der anschließenden Beobachtung des bei der Relaxation emittierten Lichts, der Fluoreszenz, basieren [16]. Dafür werden die  $A\beta$ -Peptide mit kovalent am N-Terminus gebundenen Fluorophoren markiert, unter der Annahme, dass dies den Aggregationsprozess nicht modifiziert, da dem N-Terminus nur ein geringer Einfluss auf die Aggregation zugeschrieben wird [17, 18, 19]. Allerdings konnte experimentell gezeigt werden, dass Veränderungen am N-Terminus Kinetik und Dynamik der Fibrillenbildung beeinflussen können [20]. In dieser Arbeit wird darum für vier kommerziell erhältliche und gebräuchliche Fluorophore systematisch untersucht, ob und wie sie die Oligomerbildung des  $A\beta_{40}$ -Peptids beeinflussen. Für diesen Zweck wurde eine Burst-Analyse für Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen entwickelt, mit der sich die Größenverteilung von Oligomeren analysieren lässt. Im Verbund mit Messungen von Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie können so Modifikationen der auftretenden Oligomerpopulationen quantifiziert und ihre Ursache analysiert werden.

---

<sup>1</sup>Englische Fachbegriffe, deren Übertragung ins Deutsche wenig gebräuchlich ist, werden in dieser Arbeit nicht übersetzt.

<sup>2</sup> $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  bezeichnen in diesem Text immer die Peptidformen  $A\beta(1-40)$  und  $A\beta(1-42)$ .

### **Aggregationskinetiken und -mechanismen des A $\beta$ -Peptids**

Die Bildung von Oligomeren hat jedoch nicht nur medizinische Bedeutung, sondern auch einen fundamentalen Einfluss auf die Aggregationskinetik des A $\beta$ -Peptids, da sie als erster und potentiell die Aggregationsgeschwindigkeit limitierender Schritt der Fibrillenbildung gilt [21]. Die Aggregation von Amyloiden wird üblicherweise als Keimbildungsprozess mit anschließender Elongation durch Monomeraddition beschrieben, der sich analog zu Polymerkristallisation betrachten lässt [22]. Die klassische Keimbildungstheorie beschreibt dabei die durch stochastische Fluktuationen bedingte Bildung eines stabilen sogenannten kritischen Keims einer neuen Phase innerhalb einer metastabilen alten Phase, dessen Entstehung der erste Schritt eines Phasenübergangs ist [23]. Eine generalisierte Übertragung dieses Konzepts auf die Aggregation von Proteinen wurde erstmals von *Ferrone* [24] vorgelegt und anschließend vielfach weiter entwickelt. Da für die Bildung von Amyloidfibrillen eine Konformationsänderung vom anfänglich nativ oder ungeordnet vorliegenden Peptid hin zu der die *cross*- $\beta$ -Struktur begünstigenden Form notwendig ist, muss in Keimbildungsmodellen für die Amyloidbildung neben thermodynamischen Aspekten auch dieser strukturelle Übergang berücksichtigt werden - entweder als Konformationsänderung bei Monomeren oder als Übergang löslicher Oligomere, in diesem Kontext auch Mizellen genannt, zu amyloid-begünstigenden Aggregaten [25]. Modelle, die diese Aspekte umfänglich berücksichtigen, wurden erst kürzlich vorgelegt [26, 27]. Sie verknüpfen makroskopisch beobachtbare Parameter der Aggregationskinetik mit zugrunde liegenden mikroskopischen Keimbildungsprozessen.

In dieser Arbeit wird die Aggregationskinetik des A $\beta$ 40-Peptids systematisch durch konzentrationsabhängige ThT Assays, d.h. die Beobachtung der aggregations sensitiven Fluoreszenz des Fluorophors Thioflavin T, untersucht und das Ergebnis mit Hilfe dieser Modelle analysiert. Dabei werden auch alternative Analyseformen berücksichtigt. Die Aggregationskinetik des A $\beta$ 40-Peptids wird verglichen mit derjenigen des A $\beta$ 42-Peptids sowie zweier zusätzlicher Varianten, von denen die eine aufgrund ihrer Verknüpfung mit zerebraler Amyloidangiopathie und der familiären Alzheimer-Krankheit große medizinische Relevanz besitzt. Zudem wird diskutiert, in wie weit das vorliegende aktuelle Modell zur Beschreibung der Aggregationskinetik genügt oder gegebenenfalls noch um zusätzliche Ausdrücke erweitert werden muss.

### **Flüssigkeits-FDSC-Untersuchungen der Thermostabilität des A $\beta$ 42-Peptids**

Amyloidfibrillen gelten als ungewöhnlich stabile Aggregate [28]. Vielleicht deshalb existieren nur vereinzelt Studien, die sich mit der temperaturinduzierten Auflösung amyloider Strukturen beschäftigen [29], obwohl die thermische Denaturierung weithin zur Charakterisierung nativer Proteine eingesetzt wird. Die erst kürzlich eingeführte Schnelle Dynamische Differenzkalorimetrie (FDSC) an Flüssigkeiten erweitert den Temperaturbereich, in dem thermisch induzierte Übergänge in wässrigen Lösungen untersucht werden können, auf Temperaturen oberhalb von 100 °C und besitzt Messdauern von nur wenigen Sekunden [30]. Letzteres könnte auch die Untersuchung flüchtiger Aggregationsintermediate ermöglichen, da es die Wahrscheinlichkeit verringert, dass die Aggregation während der Messung so weit fortschreitet, dass sich die in Lösung vorhandenen Aggregationspezies während des Messprozesses grundlegend verändert. Die Flüssigkeits-FDSC wird in dieser Arbeit deshalb zunächst durch Untersuchungen an Lysozym hinsichtlich Messbereich und Sensitivität charakterisiert und anschließend für die Untersuchung der Thermostabilität von A $\beta$ 42-Aggregaten eingesetzt werden.

In dieser Dissertation werden damit drei Fragestellungen zur Aggregation des A $\beta$ -Peptids aufgeworfen und untersucht:

1. Welchen Einfluss haben am N-Terminus kovalent gebundene Fluorophore auf die Bildung von Oligomeren?
2. Welche Kenngrößen kennzeichnen den Keimbildungsprozess des A $\beta$ -Peptids und genügen die aktuellen Modelle für seine Beschreibung?

3. Wo liegen Möglichkeiten und Grenzen der Flüssigkeits-FDSC und kann mit ihrer Hilfe die thermische Stabilität von A $\beta$ -Aggregaten charakterisiert werden?

Die zur Beantwortung nötigen theoretischen Grundlagen zur Aggregation von Amyloiden inklusive der Darstellung einiger sie beschreibender Modelle werden in Kapitel 2 dargelegt. Kapitel 3 beschreibt die verwendeten experimentellen Methoden, die Präparation von Proben und die Analyse der experimentell gewonnenen Daten. In Abschnitt 3.3 wird zudem die programmatische Umsetzung der selbst entwickelten Burstanalyse dargestellt. Die Kapitel 4 bis 6 enthalten Resultate und Diskussion der drei genannten Fragestellungen, die in Kapitel 7 nochmal zusammengefasst und in einen größeren Zusammenhang gestellt werden.



# 2. Grundlagen: Aggregation von Amyloiden

## 2.1. Proteinfaltung und Amyloidbildung

Proteine erfüllen in der Biologie vielfältige Aufgaben: Sie transportieren als Transportproteine Sauerstoff, Eisen oder andere essentielle Stoffe in Organismen, wirken als Immunproteine an der Immunabwehr mit, verarbeiten als Rezeptorproteine Reize, regulieren und katalysieren Stoffwechselfvorgänge von Organismen oder sind entscheidender Bestandteil fasriger Strukturen wie Muskeln oder Haare [31]. Dabei liegen sie in der Regel in einem gefalteten, sogenannten nativen Zustand vor, der sich aus ihrer Aminosäuresequenz und den physiologischen Bedingungen ergibt und in dem sie ihre biologische Funktion ausfüllen, können aber auch teilweise oder ganz entfaltet sein oder sich in Proteinaggregaten befinden. Eine sehr bekannte Klasse von Proteinaggregaten sind Amyloidfibrillen. Ihr Entstehen war zuerst verknüpft mit dem Auftreten bestimmter Krankheiten wie z.B. Alzheimer (Amyloid- $\beta$ -Peptid), Parkinson ( $\alpha$ -Synuclein) oder Huntington (Prion Protein) [32]; inzwischen werden aber zunehmend auch funktionale Amyloide untersucht, wie z.B. PMEL17 oder PTH [33, 34].

### 2.1.1. Faltung von Proteinen

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Ihre Abfolge im Protein wird als Aminosäuresequenz oder Primärstruktur bezeichnet. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren formen dabei dreidimensionale Strukturelemente, die sogenannten Sekundärstrukturen. Die beiden wichtigsten Sekundärstrukturelemente sind dabei die  $\alpha$ -Helix, in der die Peptidkette sich spiralförmig windet, und die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, charakterisiert durch eine parallele oder antiparallele Anordnung einzelner Peptidkettenabschnitte längs nebeneinander. Beide werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Weitere intermolekulare Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken, van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen ordnen verschiedene Sekundärelemente zu einer proteinspezifischen globalen Struktur an, der sogenannten Tertiärstruktur. [31]

### 2.1.2. Thermische Denaturierung

Die übergeordneten Strukturen, die Proteine einnehmen, können durch veränderte äußere Bedingungen entfaltet werden, beispielsweise unter dem Einfluss von Harnstoff oder Alkohol, unter Einwirkung mechanischer Kräfte, durch einen Wechsel des pH-Werts oder eine steigende Temperatur.

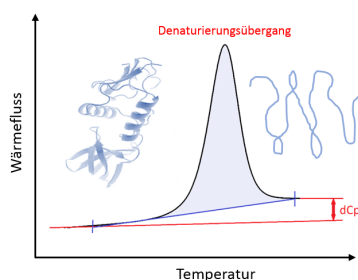


Abbildung 2.1.: **Thermische Denaturierung im DSC**

Entfalten sich Proteine unter Hitzeeinwirkung und verlieren so ihre biologische Funktion, spricht man von thermischer Denaturierung. Dieser Prozess kann sowohl reversibel als auch irreversibel verlaufen; ebenso ist es möglich, dass sich neue, von der vorherigen Konformation verschiedene Strukturen ausbilden. Temperatur und spezifische Enthalpie des Entfaltungsübergangs hängen dabei von dem untersuchten Protein ab und erlauben es die thermodynamische Stabilität des Proteins zu bestimmen. Eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität ist die Dynamische Differenz-Kalorimetrie (s. Kap. 3.5), in der die thermische Denaturierung als endothermes Signal, begleitet von einer Änderung der spezifischen Wärmekapazität,  $C_p$ , sichtbar wird (vgl. Abb. 2.1).

### 2.1.3. Entstehung von Amyloidfibrillen

Trotz der großen Varietät an Aminosäuresequenzen und nativen Konformationen, die Proteine einnehmen, können sie prinzipiell alle zu Amyloidfibrillen aggregieren, die als Zustand innerhalb der Energielandschaft von Proteinfaltung und -aggregation unter bestimmten Bedingungen das globale Minimum darstellen [4, 35]. Damit handelt es sich bei der Entstehung von Amyloiden um einen fundamentalen Mechanismus der Strukturbildung, der häufig als Keimbildungsprozess beschrieben wird (s. Kap. 2.2) und über mehrere kleinere Aggregate wie globuläre Oligomere und Protofibrillen zu voll ausgebildeten Amyloidfibrillen führt (s. Kap. 2.1.4).

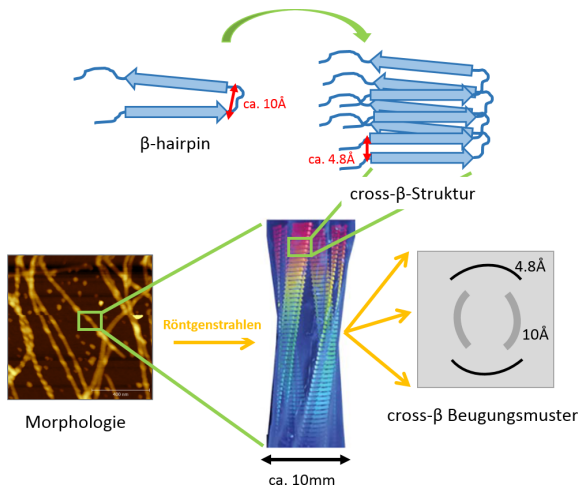


Abbildung 2.2.: **Struktur und Morphologie von Amyloidfibrillen** Die einzelnen Peptide oder Proteine formen  $\beta$ -Faltblattstrukturen wie z.B. die hier dargestellten  $\beta$ -hairpins (oben links), aus denen sich  $\beta$ -Faltblätter zusammensetzen (oben rechts). Zwei oder mehr aus diesen  $\beta$ -Faltblättern zusammengesetzte Protofilamente winden sich ineinander zu einer Fibrille zusammen (unten mittig), die in Röntgendiffraktometrie-Experimenten ein charakteristisches cross- $\beta$ -Beugungsmuster zeigt (unten rechts). Der Abstand zwischen zwei  $\beta$ -Strängen beträgt dabei ca.  $4.8 \text{ \AA}$ , die Distanz zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern ca.  $10 \text{ \AA}$ . Typischerweise ergeben sich etwa  $10 \text{ mm}$  breite, mehrere Mikrometer lange Fibrillen, deren gedrehte Morphologie z.B. mit AFM sichtbar gemacht werden kann (unten links). Die schematische Fibrillendarstellung mittig unten wurde [36] entnommen.

die aus unterschiedlichen Proteinen gebildet wurden, sondern auch innerhalb einer Fibrillenspezies; die jeweilige Morphologie wird dabei in der Regel auf die lokalen äußeren Bedingungen während des Aggregationsprozesses zurückgeführt. Charakteristisch sind jedoch  $6\text{-}12 \text{ nm}$  breite und bis zu mehrere Mikrometer lange Fibrillen, die sich aus zwei oder mehr linkshändig ineinander gedrehten Protofilamenten zusammensetzen. [4, 2, 41].

### 2.1.4. Vom Peptid zur Fibrille: Bedeutung der Oligomere

Lagern sich einzelne Peptide, in diesem Kontext Monomere genannt, zu aus mehreren tausenden Monomeren bestehenden Fibrillen zusammen, verläuft dieser Prozess nach der heute verbreiteten Vorstellung vermittelt zweier Klassen von Intermediaten: Oligomeren und Protofibrillen (vgl. Abb. 2.3). Monomere formen zunächst aus nur wenigen Peptiden zusammengesetzte Oligomere, d.h. zu

Amyloidfibrillen zeichnen sich durch bestimmte charakteristische Merkmale aus: Ihre Entstehung kann durch die spezifische Bindung von Farbstoffen wie Congo Red und Thioflavin T angezeigt werden [37] und ihre mikroskopische Struktur resultiert in Röntgendiffraktometrie-Experimenten in ein so genanntes cross- $\beta$ -Beugungsmuster [38]. Letzteres geht auf den allen Amyloidfibrillen inhärenten Aufbau aus  $\beta$ -Faltblättern mit einem Abstand von etwa  $4.8 \text{ \AA}$  entlang der Wachstumsachse zwischen den einzelnen  $\beta$ -Strängen und etwa  $10 \text{ \AA}$  senkrecht zur Wachstumsachse zwischen zwei Faltblättern zurück (vgl. Abb. 2.2) [2]. Die einzelnen Peptide oder Proteine formen dabei  $\beta$ -Stränge, die sich zum Beispiel zu einer oder mehreren „Haarklammern“ (engl.  $\beta$ -hairpin) anordnen können [4]. Durch Verzahnung der Seitenketten der Aminosäuren bilden die  $\beta$ -Faltblätter eine einem Reißverschluss ähnelnde Struktur, *steric zipper* genannt [39, 40]. Diese Struktur wird zusätzlich durch den hydrophoben Effekt, der Wassermoleküle aus dem Fibrillinneninneren ausschließt, sowie polare und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den verzahnten Seitenketten der Aminosäuren stabilisiert [4].

Während auf mikroskopischer Ebene Amyloidfibrillen unabhängig von den sie konstituierenden Peptiden oder Proteinen die gleichen strukturellen Merkmale zeigen, lässt sich im mesoskopischen Bereich eine große Bandbreite von Morphologien beobachten - nicht nur zwischen Fibrillen,

nicht-fibrillären Aggregaten, die zumeist als globuläre Spezies beschrieben werden [42, 21]. Durch Konformationsänderungen und die Addition weiterer Monomere entwickeln sich die Oligomere zu Protofibrillen weiter, d.h. zu frühen fibrillären Aggregaten, die noch nicht den hohen Ordnungsgrad und die periodische Symmetrie ausgewachsener Fibrillen aufweisen, aber bereits reich an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen sind und eine längliche Morphologie besitzen [42]. Ihr Durchmesser beträgt in der Regel weniger als 10 nm und ihre Länge weniger als 400 nm [43, 44]. Aus den Protofibrillen bilden sich schließlich die in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen finalen Amyloidfibrillen.

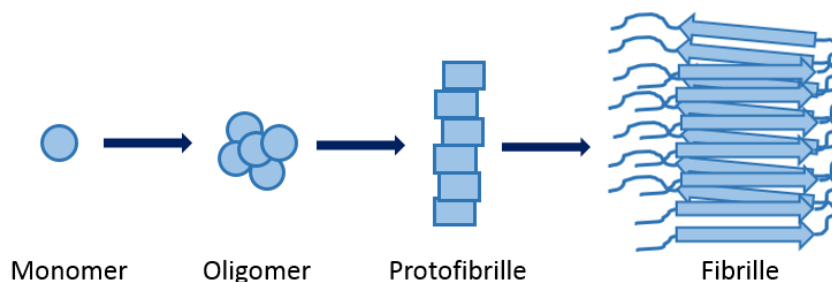


Abbildung 2.3.: **Schematische Darstellung der Entwicklung einer Amyloidfibrille aus Monomeren** Zunächst lagern sich wenige Monomere zu Oligomeren zusammen, die meist globulär sind und eine sehr heterogene Spezies darstellen. Diese entwickeln sich dann durch Konformationsänderungen und Anlagerung weiterer Monomere zu Protofibrillen weiter, die reich an  $\beta$ -Faltblättern sind und eine längliche Morphologie aufweisen. Endprodukt des Aggregationsprozesses sind die durch ihre cross- $\beta$ -Struktur charakterisierten Amyloidfibrillen. Mögliche Konkurrenzprozesse wurden in diesem Schema nicht berücksichtigt.

Als Zwischenspezies des Aggregationsprozesses treten Oligomere nur vorübergehend und in geringen Konzentrationen auf, sodass sie experimentell schwieriger zu untersuchen sind als Monomere oder Fibrillen. Überdies zeigen sie eine große Heterogenität: Die gebildeten Oligomere können nicht nur für verschiedene, sondern auch ein bestimmtes Protein variieren - dies wird als „Polymorphismus der Oligomere“ bezeichnet. Dabei differieren Oligomere hinsichtlich Größe, Form, Kompaktheit, Stabilität, Sekundär- und Tertiärstrukturen. [21] Zurückgeführt wird dieser Polymorphismus darauf, dass die Fibrillenbildung auf unterschiedlichen Aggregationspfaden - korrespondierend mit unterschiedlichen Oligomeren - verlaufen kann, dass es neben den *on-pathway*-Oligomeren, die zur Bildung von Fibrillen beitragen, auch *off-pathway*-Oligomere gibt, die nicht zu Fibrillen führen oder gar mit ihrer Bildung konkurrieren, dass es auch von Fibrillen katalysierte und von ihnen abgespaltene Oligomere und solche, die aus Disaggregationsreaktionen entstehen [21, 45].

Trotz ihrer flüchtigen Natur und ihrer großen Heterogenität gewannen Oligomere in den letzten Jahren in der Amyloidforschung zusehend an Interesse: Zum einen kristallisiert sich zunehmend heraus, dass sie und nicht, wie zunächst gedacht, Amyloidfibrillen, die toxische Spezies neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson darstellen [9, 46]. Zum anderen stellt ihre Bildung den ersten und potentiell raten-limitierenden Schritt der Amyloidaggregation dar, sodass die Untersuchung der Entstehung von Oligomeren fundamental sowohl hinsichtlich des Verständnis von Strukturbildung als auch Kinetik ist [21].

## 2.2. Mechanismen der Amyloidaggregation

Der Aggregationsmechanismus, der einzelne Peptide oder Proteine zu Amyloidfibrillen mit tausenden von Monomeren zusammenführt, wird üblicherweise als Keimbildungs-abhängige Polymerisationsreaktion verstanden, die sich analog zu Kristallisationsprozessen betrachten lässt. Als essentielle Schritte enthält sie Keimbildung und Elongation, d.h. die Verlängerung der Fibrillen durch immer weitere Anlagerung einzelner Monomere an ihr Ende. Limitiert wird die Kinetik dabei durch die Energiebarriere der Keimbildungsreaktion. [22]

Modelle, die eine solche von der Keimbildung abhängige Polymerisation beschreiben, stützen sich auf die von *Volmer und Weber* [47] ursprünglich für die Entstehung von Wassertropfen in einer übersättigten Dampfphase entwickelte klassische Keimbildungstheorie. Deren Grundzüge werden in Abschnitt 2.2.1 dargelegt. *Oosawa und Kasai* transferierten dieses Konzept erstmals auf eine Proteinaggregation, indem sie es nutzen, um die Polymerisation von Aktin zu beschreiben [48]. *Ferrone* legte 1999 eine erste generalisierte Theorie der Aggregation von Proteinen vor, die klar auf die für Dampfkondensation entwickelten Konzepte der klassischen Keimbildungstheorie rekurriert [24]. Da sie die Grundlage für spätere, umfassendere Theorien der Amyloidfibrillierung bilden, werden die Konzepte von Oosawa und Ferrone in Abschnitt 2.2.2 vorgestellt. Aufgrund der engen Analogie zu Polymerisationsmodellen und da sie nicht speziell die Bildung von Amyloidfibrillen mit ihrer spezifischen Struktur betrachten, wird in ihren Arbeiten - z.T. auch in diesem Text - statt von Fibrillen von Polymeren gesprochen, wenn Aggregate aus mehreren Peptiden oder Proteine gemeint sind.

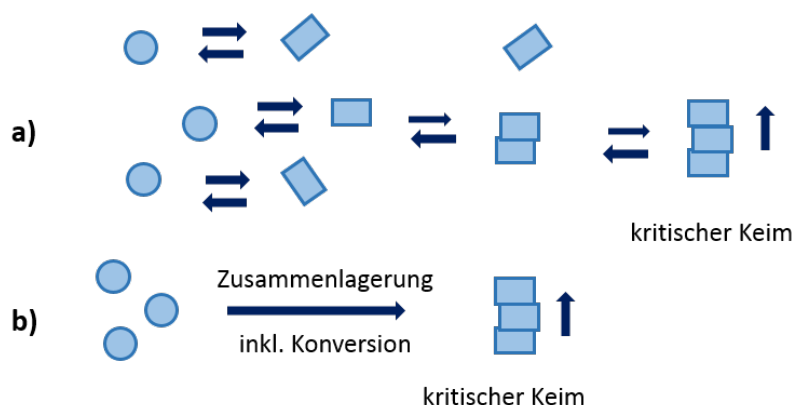


Abbildung 2.4.: **Mögliche Szenarien einer *One-Step-Nucleation*** Dargestellt sind zwei Möglichkeiten, die Aggregation von Amyloiden als Keimbildungs-abhängige Polymerisationsreaktion zu verstehen, ohne explizit einen Konversionsschritt hin zu einer an  $\beta$ -Strängen reichen Konformation zu berücksichtigen: Zum einen könnte der Konversionsschritt bereits auf Monomerebene stattfinden und es tragen nur solche Monomere zur Keimbildung bei, die bereits reich an  $\beta$ -Strukturen sind (a). Zum anderen könnte die Konformationsänderung auch während der Zusammenlagerung der Monomere so schnell geschehen, dass ihre Rate vernachlässigt werden kann (b). In der Abbildung sind Monomere mit nativer Konformation rund dargestellt und Monomere mit amyloid-begünstigender Struktur als Quader.

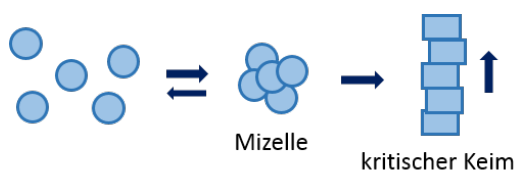


Abbildung 2.5.: **Schematische Darstellung der *Two-Step-Nucleation*** Monomere lagern sich zunächst zu einem globulären Oligomer, in diesem Kontext Mizelle genannt, zusammen, das anschließend eine Konformationsänderung hin zu einem  $\beta$ -Strang-reichen Oligomer durchläuft. Diese fibrilläre Oligomer bildet dann den kritischen Keim für weiteres Fibrillenwachstum.

Initialer Schritt jeder Amyloidbildung ist die primäre Keimbildung, d.h. die durch stochastische Fluktuationen bedingte Zusammenlagerung mehrerer Monomere zu einem sogenannten Keim, von dem ausgehend durch Addition weiterer Monomere Fibrillen entstehen. Für Amyloide enthält der Keimbildungsprozess für Amyloide zwingend einen zusätzlichen Umstrukturierungsprozess der zuvor nativ vorliegenden Monomere, da diese für den Einbau in Amyloidfibrillen in einer Form vorliegen müssen, die den Bausteinen der cross- $\beta$ -Struktur entsprechen. Eine solche Form wäre etwa die *hairpin*-Form des  $A\beta_{40}$ -Peptids. Eine Möglichkeit, diesen Umstrukturierungsprozess in die

Beschreibung der primären Keimbildung einzubeziehen, besteht darin, dass bereits die in Lösung befindlichen Monomere in die neue Konformation übergehen und dann den Keim für weiteres fibrilläres Wachstum bilden (vgl. Abb. 2.4) [25]. Alternativ wäre auch denkbar, dass die Zusammen-



lagerung die Konformationsänderung der Monomere hin zur  $\beta$ -Struktur induziert. Dieser Prozess wird Keimbildungs-Polymerization mit Monomerkonversion oder, nur auf die Keimbildung bezogen, *One-Step Nucleation* genannt. [49] Ein solches Schema wird in der modernen Literatur z.B. von *Kashchiev und Auer* vorgelegt [50].

Eine Alternative zur *One-Step-Nucleation* stellt der *Two-Step-* oder *Multi-Step-Nucleation*-Prozess dar: Hier formen nicht oder nur teilweise strukturierte Monomere zunächst ein kleines, ungeordnetes Oligomer, in diesem Kontext oft Mizelle genannt, das dann in einem Konversionsschritt eine amyloid-begünstigende  $\beta$ -Faltblatt-reiche Struktur annimmt. Dieses strukturierte Aggregat ist dann der Keim für eine weiter wachsende Fibrille (vgl. Abb. 2.5). Ein solches Schema wurde für die Amyloidbildung erstmals von *Lomakin et al.* beschrieben [51] und anschließend weiterentwickelt (vgl. bspw. [25, 52, 53]).

Bei der Entwicklung detaillierter Modelle zur Erklärung der Amyloidbildung haben sich besonders die Gruppen von *Knowles* und *Dobson* hervorgetan. Ihre Modelle wurden primär anhand von Studien der A $\beta$ -Fibrillierung entwickelt, beanspruchen aber darüber hinausgehende Gültigkeit und inkludieren neben Primärkeimbildung und Elongation auch Sekundärkeimbildungsprozesse, Fragmentation oder die Sättigung von Keimbildungsprozessen (vgl. bspw. [54, 55, 56]). *Finkelstein et al.* integrierten zudem die Möglichkeit einer konkurrierenden *off-pathway*-Oligomerbildung [57]. Erst seit kurzem werden in diesen komplexen Modellen auch Konversionsschritte, also die Möglichkeit einer *Two-Step-Nucleation*, berücksichtigt [26, 27, 58]. Kapitel 2.2.3 gibt eine Übersicht wichtiger Modelle, die in jüngster Zeit insbesondere im Hinblick auf die Amyloidbildung des A $\beta$ -Peptids entwickelt worden sind. Dabei werden auch die verschiedenen Prozesse der Fibrillierung - primäre und sekundäre Keimbildung, Elongation, Fragmentation und Konversion - erklärt und bildlich dargestellt.

### 2.2.1. Klassische Keimbildungstheorie

Das Konzept der Keimbildung vermag auf den ersten Blick so unterschiedliche Phänomene wie die Kondensation von Wasser, die Kristallisation von Polymeren, das Entstehen neuer Galaxien oder die Ausbildung magnetischer Domänen zu beschreiben. Keimbildung stellt den ersten Schritt bei Phasenübergängen erster Ordnung dar und bezeichnet das spontane Entstehen eines kleinen Bereichs einer neuen Phase innerhalb einer alten Phase, der weiterwächst, sofern er ein gewisses kritisches Volumen überschreitet. Sie wurde als Konzept bereits 1926 von *Volmer und Weber* [47] eingeführt; die von ihnen entwickelte Theorie ist als Klassische Keimbildungstheorie bekannt.

Gemäß der Klassischen Keimbildungstheorie erzeugen stochastische Fluktuationen innerhalb einer metastabilen Phase kleine Bereiche einer neuen Phase, sogenannte Keime, die potentielle Ausgangspunkte eines vollständigen Phasenübergangs darstellen, falls sie ausreichend groß sind, um die thermodynamische Barriere für diesen Phasenübergang zu überwinden. Keime, welche diese Mindestgröße besitzen, werden als kritische Keime bezeichnet. Es können verschiedene Formen der Keimbildung unterschieden werden, z.B. homogene und heterogene oder primäre und sekundäre Nukleation. Der einfachste Fall ist der einer homogenen primären Keimbildung, bei der die neue Phase innerhalb einer homogenen alten entsteht. Heterogene Keimbildung findet demgegenüber an Grenzflächen statt; sekundäre Nukleation wird durch bereits vorhandene Bereiche der neuen Phase katalysiert. [23]

Im Fall der homogenen primären Keimbildung lässt sich die Änderung der Gibbs'schen freien Energie durch die Bildung eines kugelförmigen Keims mit Radius  $r$  schreiben als

$$\Delta G(r) = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta g + 4\pi r^2 \gamma \quad (2.1)$$

Der erste Term beschreibt die Minimierung der Gibbs'schen freien Energie durch das Vorhandensein der neuen Phase in Abhängigkeit vom Volumen des Keims. Dabei bezeichnet  $\Delta g$  den Energiegewinn pro Volumeneinheit. Der zweite zur Oberfläche des Keims proportionale Term quantifiziert die

Gibbs'sche freie Energie, die aufgewendet werden muss, um die Grenzfläche zwischen alter und neuer Phase zu bilden, wobei  $\gamma$  die spezifische Grenzflächenenergie dieser Phasen darstellt. [23]

Die beiden Beiträge zur Gibbs'schen freien Energie resultieren in eine Energiebarriere, die überwunden werden muss, damit der entstandene Keim wachsen und einen vollständigen Phasenübergang einleiten kann (vgl. Abb. 2.6). Die Höhe dieser Energiebarriere ist gegeben durch

$$\Delta G^* = -\frac{16\pi}{3} \frac{\gamma^3}{\Delta g^2} \quad (2.2)$$

Die mit dieser Energiebarriere korrespondierende kritische Keimgröße wird für den Radius

$$r_{crit} = \frac{2\gamma}{\Delta g} \quad (2.3)$$

erreicht. [23] Weitere Details der Klassischen Keimbildungstheorie sind in der Literatur ausführlich beschrieben (z.B. [47, 23]) und führten an dieser Stelle zu weit; im Folgenden soll stattdessen die Anwendung dieses Konzepts auf die Aggregation von Proteinen (s. Kap. 2.2.2) und insbesondere die Fibrillierungskinetik des A $\beta$ -Peptids (s. Kap. 2.2.3) vorgestellt werden.

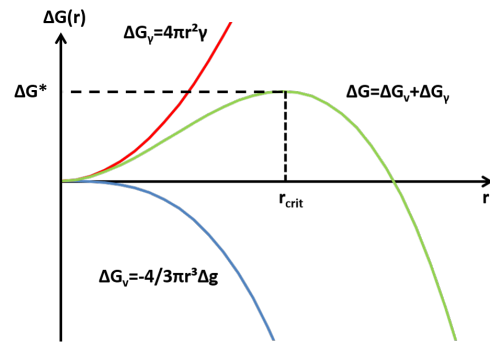


Abbildung 2.6.: **Verhalten der Gibbs'schen freien Energie bei der homogenen Keimbildung** Der aus dem Phasenübergang resultierende Energiegewinn ( $\Delta G_v$ ) und die benötigte Energie zur Bildung der Grenzfläche zwischen neuer und alter Phase ( $\Delta G_\gamma$ ) resultieren in eine Energiebarriere, deren Maximum den Radius  $r_{crit}$  des kritischen Keims festlegt.

### 2.2.2. Adaption für Proteine und Peptide bei Oosawa und Ferrone

*Oosawa und Kasai* [48] wandten das Konzept der Keimbildung erstmals auf Proteine an: Sie beschrieben damit den Übergang des Faserproteins Aktin, eines der wichtigsten Proteine in Muskelzellen, von seiner globulären Form (G-Aktin) zu fibrösem F-Aktin. G-Aktin wurde von ihnen als „lineares Polymer“ bezeichnet und F-Aktin als „helikales Polymer“, wobei letzteres der zu Fasern aggregierten Form entspricht und ersteres in ihren Überlegungen nur als Monomer oder in Form kleinerer Aggregate beobachtet wurde. Abbildung 2.7 zeigt schematisch den G- zu F-Aktin-Übergang, wie er von Oosawa und Kasai beschrieben wurde.

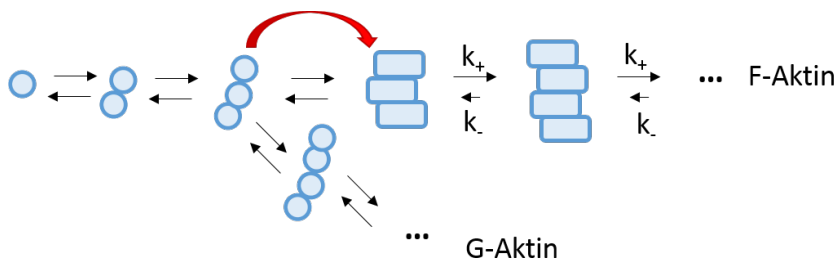


Abbildung 2.7.: **Schema der von Oosawa und Kasai beschriebenen Proteinaggregation** Globuläres G-Aktin bildet kurze Polymere, die sich oberhalb einer kritischen Konzentration durch eine Konformationsänderung (rot gekennzeichnet) zu fibrösem F-Aktin umwandeln, das anschließend weiter polymerisiert.

Oberhalb einer bestimmten kritischen Aktin-Konzentration in einer Lösung beginnen sich fibröse F-Aktin-Aggregate zu bilden, die schließlich einen Gleichgewichtszustand mit dispergierten Monomeren und einem geringen Anteil linearer G-Aktin-Polymere erreichen. Um diesen Prozess zu beschreiben, betrachteten Oosawa und Kasai zunächst einen Gleichgewichtszustand und untersuchten dann, was passiert, wenn durch eine plötzliche Veränderung der äußeren Bedingungen die

Bildung von F-Aktin-Aggregaten initiiert wird. [48]

In ihren Überlegungen gehen sie davon aus, dass die Bildung eines linearen Polymers  $p_{i+1}$ , das aus  $(i + 1)$  globulären Monomeren besteht, dadurch beschrieben werden kann, dass ein Monomer sich an das Ende eines  $i$ mers anlagert; die Gleichgewichtskonstante, die diesen Prozess beschreibt, sei  $a_i$ . Bei einer Zahlenkonzentration der Monomeren  $m$  lässt sich das Entstehen eines  $(i + 1)$ mers dann als

$$p_{i+1} = a_i p_i m = a_i (a_{i-1} p_{i-1} m) m \quad (2.4)$$

schreiben. Geht man weiter davon aus, dass die freie Bindungsenergie der Anlagerung eines Monomers an ein Polymerende unabhängig von der Länge des Polymers ist, also  $a \equiv a_i \forall i$ , vereinfacht sich dieser Ausdruck zu

$$p_i = a^{-1} (am)^i \quad (2.5)$$

für lineare Polymere mit einer beliebigen Zahl  $i$  an Monomeren. [48]

Die Konformationsänderung von der linearen  $p$ - zur fibrösen, helikalen  $p_h$ -Form kann mittels einer weiteren Konstante  $s$  beschrieben werden, sodass

$$p_{ih} = s p_i \quad (2.6)$$

gilt. Daraus folgt für die anschließende Bildung eines  $p_{(i+1)h}$ mers durch Anlagerung eines Monomers

$$p_{(i+1)h} = b p_{ih} m = b s p_i m = b s a^{-1} (am)^i m = a^{-1} \sigma (bm)^i \quad (2.7)$$

mit  $\sigma = s(a/b)$ . Dabei ist  $b$  die Gleichgewichtskonstante zur Beschreibung der Anlagerung eines Monomers an das Ende eines helikalen Aggregats, die wiederum unabhängig von der Länge des vorhandenen Aggregats sein soll. [48]

Triggern nun sich verändernde äußere Bedingungen die Formation der fibrösen F-Aktin-Aggregate, müssen die Gleichgewichtskonstanten  $a$ ,  $b$  und  $s$  durch zeitabhängige Geschwindigkeitskonstanten  $k_+$  und  $k_-$  für Assoziation und Dissoziation bzw.  $k'_+$  und  $k'_-$  für den Übergang zu helikalen bzw. linearen Aggregaten ersetzt werden. Um ihre Rechnungen zu vereinfachen, nahmen Oosawa und Kasai an, dass die Assoziationsrate  $k_+ m$  für die Anlagerung von Monomeren an helikale Polymere erheblich größer ist als die entsprechende Dissoziation - gerechtfertigt durch das zu beschreibende Szenario, dass plötzlich massiv helikale F-Aktin-Aggregate gebildet werden - und dass  $m_i \approx m^i$  ist, weil lineare Aggregation sehr viel schneller geschieht als die Konversion in die F-Aktin-Form, die in ihrem Modell als ratenlimitierender Schritt aufgefasst wird. [48]

Aus diesen Überlegungen ergibt sich - für die einzelnen mathematischen Schritte s. [48] - dass der Prozess der Bildung von fibrösen F-Aktin-Aggregaten mittels der Gleichung

$$\ln \left( \frac{1 + \left(1 - \frac{m^{n_c}}{m_0^{n_c}}\right)^{1/2}}{1 - \left(1 - \frac{m^{n_c}}{m_0^{n_c}}\right)^{1/2}} \right) = n_c \left( \frac{2}{n_c} k_+ c \right)^{1/2} m_0^{\frac{n_c}{2}} t \quad (2.8)$$

beschrieben werden kann. Dabei ist  $m_0$  die Monomerkonzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $c$  eine Konstante und  $n_c$  die Anzahl der Monomere, die sich während des Konversionsschrittes von linearem zu helikalem Polymer im Aggregat befinden. Die Halbwertszeit  $t_{50}$  der helikalen Polymerisation, also der fibrösen Aggregation, die eine der wichtigsten Kenngrößen auch der Beschreibung von Amyloidbildungskinetiken ist, folgt dann als

$$t_{50} = \frac{const.}{n_c \left( \frac{2}{n_c} k_+ const. \right)^{1/2} m_0^{\frac{n_c}{2}}} \propto m_0^{-\frac{n_c}{2}} \quad (2.9)$$

wobei  $const.$  sich aus dem linken Term in Gleichung 2.8 ergibt, der aufgrund der zum Zeitpunkt  $t_{50}$  festgesetzten Monomerkonzentration  $m$  keine Variablen mehr enthält. [48]

Die Relation  $t_{50} \propto m_0^{-n_c/2}$  wird bis heute genutzt, um aus konzentrationsabhängig aufgenommenen Aggregationskinetiken bei ansonsten gleichen Bedingungen die Größe des kritischen Keims der primären Nukleation zu bestimmen (vgl. bspw. [54]). Beachtet werden sollte dabei, dass die Größe  $n_c$ , so wie sie von Oosawa und Kasai definiert wurde, gleich zwei Schritte enthält: die Bildung eines primären Keims in Form eines globulären Aggregats als Reaktion der Ordnung  $n_{01}$  und eine Konversion in die fibrilläre Form, die als Reaktion der Ordnung  $n_{conv}$  beschrieben werden kann. Diese Beobachtung ist deshalb wichtig, weil in den geläufigsten modernen Modellen zur Beschreibung der Aggregationskinetik des Amyloid- $\beta$ -Peptids erst seit dem Jahr 2020 die Notwendigkeit eines Konversionsschrittes mitberücksichtigt wird (vgl. [26] und [27]). Die Details dazu werden in Abschnitt 2.2.3 erläutert.

Eine generalisierte Betrachtung der Proteinaggregation, bei der die Anleihen an die in Abschnitt 2.2.1 angerissene klassische Keimbildungstheorie sehr deutlich hervortreten, legte 1999 *Ferrone* in einem vielzitierten Review vor [24]. In diesem Artikel skizzierte er auch ein Modell der Sekundärkeimbildung, die aber zu diesem Zeitpunkt allgemein noch kaum untersucht wurde. Deshalb wird sie hier zunächst ausgeklammert (s. stattdessen Kap. 2.2.3) und dafür die Grundidee seines Modells der homogenen primären Keimbildung dargelegt.

Analog zu Oosawa beschreibt Ferrone den Proteinaggregationsprozess formal als eine Additionsreaktion, bei dem sich ein Monomere an die Enden eines bereits vorhandenen Polymers anlagern:



$P_i$  bezeichnet dabei ein Polymer mit  $i$  Monomeren und  $m$  repräsentiert ein Monomer. Betrachtet man die Aggregate nun erstens als thermodynamische Spezies statt als kinetische Zwischenzustände auf dem Weg zu Polymeren maximaler Länge bzw. zu voll ausgebildeten Fibrillen, und geht zweitens davon aus, dass die ersten Polymerisationsschritte energetisch ungünstig sind, bis eine bestimmte Polymerlänge - korrespondierend zu  $n_c$  Monomeren - erreicht wurde, dann folgt



Die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Polymerspezies  $P_i$  im Gleichgewichtszustand vorzufinden, ist dann durch

$$[P_i] = m_0 \exp\left(-\frac{\Delta G(n)}{RT}\right) \quad (2.12)$$

gegeben, wobei  $G$  die Gibbs'sche freie Energie darstellt,  $T$  die Temperatur und  $R$  die universelle Gaskonstante. Die initiale Monomerkonzentration  $m_0$  könnte auch durch eine andere Standardkonzentration ersetzt werden, dies ist aber eher unüblich. Die eckigen Klammern indizieren, dass  $P_i$  nicht bloß Polymere mit  $i$  Monomeren symbolisieren soll, sondern die Konzentration des jeweiligen *imers* gemeint ist. [24]

Im Gleichgewicht gilt außerdem, dass

$$k_i^+ m_0 [P_i] = k_{i+1}^- [P_{i+1}] \quad (2.13)$$

ist, wobei  $k^+$  und  $k^-$  die Assoziations- bzw. Dissoziationsrate bezeichnen. Beide Gleichungen 2.12 und 2.13 zusammengenommen resultieren in ein Verhältnis

$$\frac{[P_{i+1}]}{[P_i]} = \exp\left(-\frac{\frac{\Delta G(n+1) - \Delta G(n)}{(n+1) - n}}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{d\Delta G(n)/dn}{RT}\right) \quad (2.14)$$

der Konzentrationen der Aggregate  $P_i$  und  $P_{i+1}$ . Der Wendepunkt des Ausdrucks  $d\Delta G(n)/dn$  entspricht dabei der Größe des kritischen Keims  $n_c$  und es ergibt sich die in Abbildung 2.8 dargestellte Funktion für  $\Delta G$ , die genau analog zu der in Abb. 2.6 gezeigten ist (vgl. Kap. 2.2.1). [24]

Die Konzentration der kritischen Keime stellt damit eine Barriere für weitere Aggregation dar - die Bildung größerer Polymere wird durch die Population der kritischen Keime und die Wachstumsrate derselben begrenzt. Die Rate  $dP/dt$ , mit der Polymere entstehen, lässt sich demnach als

$$\frac{dP}{dt} = k_c^+ [n_c] \quad (2.15)$$

schreiben, wobei  $[n_c]$  die Konzentration kritischer Keime darstellt und  $k_c^+$  die Rate ist, mit der sich Monomere an die kritischen Keime anlagern. Geht man wieder - wie schon bei Oosawa - davon aus, dass die Assoziationsrate der Monomere  $k^+$  unabhängig von der Polymerlänge ist, kann die zeitabhängige Konzentration  $dm_p/dt$  von Monomeren, die ein Polymere eingebaut wurden, mittels

$$\frac{dm_p}{dt} = k^+ P \quad (2.16)$$

berechnet werden. Überdies gilt für die initiale Gesamtkonzentration der Monomere  $m_0$  natürlich, dass sie die Summe aus polymerisierten Monomeren  $m_p$  und freien Monomeren  $m$  ist, also

$$m_0 = m_p(t) + m(t) \quad (2.17)$$

gültig ist. [24] Das aus 2.15 bis 2.17 bestehende Gleichungssystem zur Beschreibung der primären Keimbildungsreaktion kann allerdings nicht analytisch gelöst werden. Dieses Problem umgeht Ferrone mit Hilfe von Störungstheorie, d.h. der Betrachtung kleiner Abweichungen vom Gleichgewichtszustand. Dabei nutzt er den Ansatz

$$m_p = A - (-\cos(Bt)) \quad (2.18)$$

Für eine detaillierte Lösung sei auf [24] verwiesen. An dieser Stelle entscheidend ist, dass der Term  $1/B$  eine Zeitkonstante der Nukleation darstellt - i.d.R. wird hier die Lagzeit (s. Kap. 3.4.4) verwendet - und dass für ihn

$$\frac{1}{B} \propto m^{-\frac{n_c+1}{2}} \quad (2.19)$$

gilt [24]. Diese Relation ähnelt dem von Oosawa in Gleichung 2.9 gefundenen Zusammenhang, unterscheidet sich allerdings von diesem durch das zusätzlich +1 im Exponenten. Nach Ferrone erhält man mit der von Oosawa verwendeten Relation, die auch in aktuelleren Modellen (vgl. Kap. 2.2.3) verwendet wird, allerdings nicht den thermodynamischen kritischen Keim, entsprechend dem Maximum der zu überwindenden Energiebarriere, sondern das um ein Monomer größere erste Aggregat, das stabil weiter aggregiert statt zu dissoziieren [59].

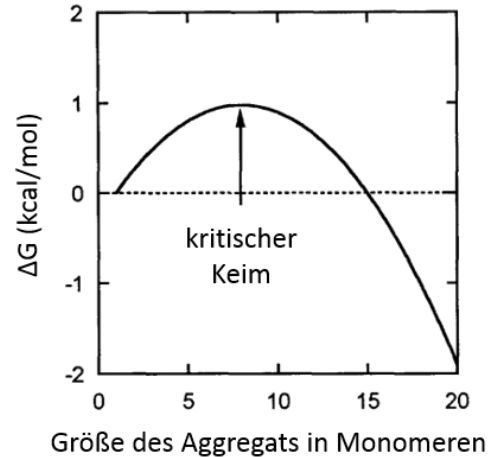


Abbildung 2.8.: **Gibbs'sche freie Energie der Keimbildung von Amyloiden** Wie in der klassischen Keimbildungstheorie bildet die Gibbs'sche freie Energie für die Entstehung eines Aggregats aus mehreren Monomeren eine Energiebarriere. Das Aggregat mit der entsprechenden Anzahl an Monomeren entspricht dann dem thermodynamischen kritischen Keim. Adaptiert nach [24].

### 2.2.3. Modelle zur Beschreibung der Aggregationskinetik des Amyloid- $\beta$ -Peptids

Das umfassendste, stetig erweiterte Modell zur Beschreibung der Aggregationskinetik des A $\beta$ -Peptids wurde von den Gruppen *Knowles*, *Linse* und *Dobson* in mehreren Artikeln im letzten Jahrzehnt entwickelt (vgl. bspw. [26, 27, 56, 58, 60, 61]). Nach Einführung der in diesem Abschnitt verwendeten Notation werden in einem ersten Schritt die verschiedenen Aggregationsprozesse vorgestellt werden, die in ihrem Modell berücksichtigt werden. Anschließend werden diese Einzelprozesse zu einer vollständigen Beschreibung der Amyloidbildung gemäß ihrem Modell zusammengeführt. Zur einfachen Analyse von konzentrationsabhängigen Aggregationskinetiken wurde aus dem Modell ein Zusammenhang zwischen initialer Monomerkonzentration und charakteristischen Zeitkonstanten der Aggregation abgeleitet [54, 55] - dieser wird in einem dritten Schritt vorgestellt. Von *Dovidchenko et al.* [62, 63] wurde ein alternatives Modell eingeführt, das auf ähnlichen Ansätzen beruht, aber alternative Zeitkonstanten der Aggregation einführt. Dieses Modell wird ergänzend ebenfalls skizziert und in einem fünften Schritt die Abhängigkeit dieser Zeitkonstanten von der initialen Monomerkonzentration aufgezeigt.

#### Verwendete Notation

Für eine vollständige Beschreibung der Aggregationskinetik müssen die zeitabhängigen Entwicklungen von Monomer- und Fibrillen- sowie ggf. Oligomerkonzentration während des Fibrillierungsprozesses modelliert werden. In Anlehnung an *Dear et al.* [26] wird von nun an die folgende Notation für die zeitabhängige Konzentration der verschiedenen Spezies verwendet:

- $m(t)$  ... Konzentration freier Monomere
- $M(t)$  ... Gewichtskonzentration der Fibrillen (äquivalent zur Konzentration der Monomere, die in Fibrillen gebunden sind)
- $P(t)$  ... Zahlenkonzentration der Fibrillen
- $S(t)$  ... Oligomerkonzentration

Mit Oligomeren sind hierbei kleine nicht-fibrilläre Aggregate gemeint, wohingegen „fibrilläre Oligomere“ und Protofibrillen, die äquivalent zu fertig ausgebildeten Fibrillen durch simple Monomeraddition wachsen, wie Fibrillen behandelt werden und in die Konzentration  $M(t)$  eingehen.

Für die Gesamtkonzentration an Monomeren  $m_{tot}$  gilt demnach, unter Vernachlässigung der in globulären Oligomeren gebundenen Monomere, da solche Oligomere die am geringsten populierte Spezies des Aggregationsprozesses sind,  $m_{tot} \approx m(t) + M(t)$ . Befinden sich in der Ausgangslösung für die Fibrillierung nur Monomere, gilt außerdem dass die initiale Konzentration freier Monomere  $m_0$  der Gesamtkonzentrationen an Monomeren entspricht, d.h.  $m_0 = m_{tot}$ . [26]

#### An der Amyloidbildung beteiligte Prozesse nach *Dobson*, *Knowles* und *Linse*

Bereits vorhandene Fibrillen oder kleinere fibrilläre Aggregate wachsen durch Elongation, d.h. über die Addition von Monomeren an eines der beiden Fibrillenden (vgl. Abb. 2.9). Die Rate der Elongation lässt sich dementsprechend schreiben als

$$k_{elong} = 2k_+m(t)P(t) \tag{2.20}$$

da sie nur von der Zahl der vorhandenen Fibrillen und Monomere sowie der Rate  $k_+$ , mit der sich Monomere an eines der Enden anlagern, abhängt. Der Faktor 2 ergibt sich aus der Tatsache, dass zwei Fibrillenden vorhanden sind. [55, 56, 26] Zur Vereinfachung der weiteren mathematischen Verarbeitung dieses Ausdrucks mit dem Ziel, eine vollständige Beschreibung der Aggregationskinetik zu erhalten, sei weiterhin

$$\mu := 2k_+m(t) \tag{2.21}$$

sodass sich für die Rate der Elongation  $k_{elong} = \mu P(t)$  ergibt [27].

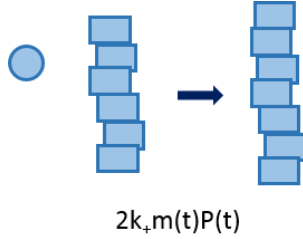


Abbildung 2.9.: **Elongation**  
Wachstum fibrillärer Aggregate durch die Anlagerung eines Monomers.

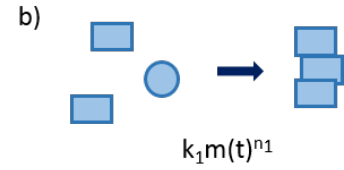
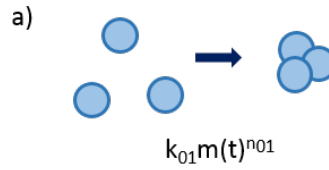


Abbildung 2.10.: **Zusammenlagerung von Monomeren** Lagern sich Monomere zu nicht-fibrillären Oligomeren zusammen (a), muss in einem zweiten Schritt eine Konformationsänderung erfolgen. Alternativ kann die Zusammenlagerung bereits einen Konversionsschritt zur  $\beta$ -Konformation enthalten (b).

Ein notwendiger initialer Schritt, um aus einer reinen Monomerlösung Fibrillen zu erhalten, die wachsen können, ist die Zusammenlagerung von Monomeren (vgl. Abb. 2.10). Vernachlässigt man die Notwendigkeit eines Konversionsschritts oder geht davon aus, dass es sich bei der primären Keimbildung um *One-step-Nucleation* handelt, bei der entweder die Konversion erheblich schneller passiert als das Formen eines kleinen Aggregats oder bereits die Monomere in einer amyloidbegünstigenden Struktur vorliegen, entspricht dieser Schritt der primären Keimbildung und die Rate der primären Keimbildung kann geschrieben werden als [54, 55]:

$$k_{prim} = k_1 m(t)^{n_1} \quad (2.22)$$

Für die Entstehung neuer Fibrillen durch primäre Keimbildung insgesamt, d.h. das Bilden eines Keims gefolgt von stetiger Verlängerung des Keims durch Monomeraddition, erhält man dann eine effektive Rate  $\lambda$ , die durch

$$\lambda = (2k_+ k_1 m_{tot}^{n_1})^{\frac{1}{2}} \quad (2.23)$$

gegeben ist. [54, 55, 56]

Während diese Modelle nicht spezifizieren, inwiefern Konversion bzw. die Bildung eines ungeordneten Aggregats zum kritischen Keim  $n_1$  und der intrinsischen Keimbildungsrate  $k_1$  beitragen, unterscheidet die im letzten Jahr in zwei Artikeln ([27, 26]) publizierte Version sorgfältig zwischen dem ersten Nukleationsschritt, bei dem sich Monomere zu einem ungeordneten Oligomer zusammenlagern, und einer anschließend notwendigen Konversion. Dafür werden  $n_1$  und  $k_1$  durch die Größen  $n_{01}$  und  $n_{conv}$  bzw.  $k_{01}$  und  $k_{conv}$  ersetzt. Dabei gelten die folgenden Zuordnungen [26]:

- $k_{01}$  ... Rate, mit der ein Oligomer geformt wird
- $k_{conv}$  ... Rate, mit der ein unstrukturiertes Oligomer die Konformationsänderung in eine fibrilläre Struktur durchläuft.
- $n_{01}$  ... Ordnung der primären Keimbildungsreaktion
- $n_{conv}$  ... Ordnung der Konformationsänderungsreaktion

Die primäre Zusammenlagerung zu einem Oligomer kann mit diesen neuen Variablen dann als

$$k_{prim} = k_{01} m(t)^{n_{01}} := \alpha_1 \quad (2.24)$$

geschrieben werden. Ihr folgt ein Konversionsschritt von nicht-fibrillären Oligomeren zu fibrillären Aggregaten (vgl. Abb. 2.11), der durch

$$k_{conversion} = k_{conv} m(t)^{n_{conv}} S(t) = \rho_c S(t) \quad (2.25)$$

gegeben ist. Dabei sei  $\rho_c$  die Konversionsrate für die jeweilige Aggregationssituation. [26]

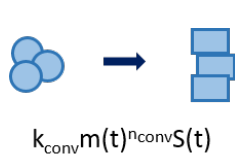


Abbildung 2.11.: **Konversion eines Oligomers** Konformationsänderung eines globulären Oligomers in ein fibrilläres Aggregat.

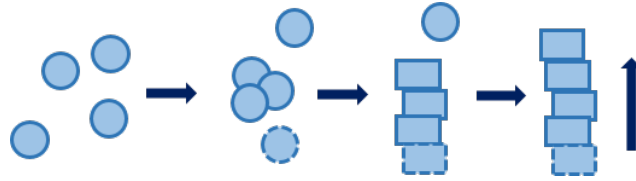


Abbildung 2.12.: **Entstehung einer Fibrille durch primäre Keimbildung** Unter Berücksichtigung eines expliziten Konversionsschrittes entsteht zunächst ein globuläres Oligomer, das dann - ggf. unter Reaktion mit weiteren Monomeren - seine Konformation in eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Form ändert. Ausgehend von diesem fibrillären Keim wächst dann die Fibrille durch Anlagerung von Monomeren.

Damit ausgehend von einer primären Keimbildungsreaktion Fibrillen entstehen, sind in dem hier skizzierten Bild also drei Schritte notwendig (vgl. Abb. 2.12): erstens die primäre Keimbildungsreaktion, bei der ein noch ungeordnetes Aggregat entsteht, zweitens eine Konversion dieses Aggregats in eine fibrilläre Struktur und drittens die anschließende Elongation durch Monomeraddition. Die effektive Rate  $\bar{\lambda}$  dieses Prozesses beträgt [27, 26]:

$$\bar{\lambda} = (2k_+ k_{01} k_{conv} m_{tot}^{n_{01} + n_{conv}})^{\frac{1}{3}} \quad (2.26)$$

In analoger Weise wurde die Sekundärkeimbildung, d.h. die Entstehung eines neuen Keims an einer Fibrilloberfläche (vgl. Abb. 2.13), zunächst ohne spezifische Distinktion des Konversionsschrittes als

$$k_{sec} = k_2 m_{tot}^{n_2} M(t) \quad (2.27)$$

definiert und die Entstehung neuer Fibrillen durch Sekundärkeimbildung und anschließende Elongation hat dann die effektive Rate [54, 55, 56]:

$$\kappa = (2k_+ k_2 m_{tot}^{n_2 + 1})^{\frac{1}{2}} \quad (2.28)$$

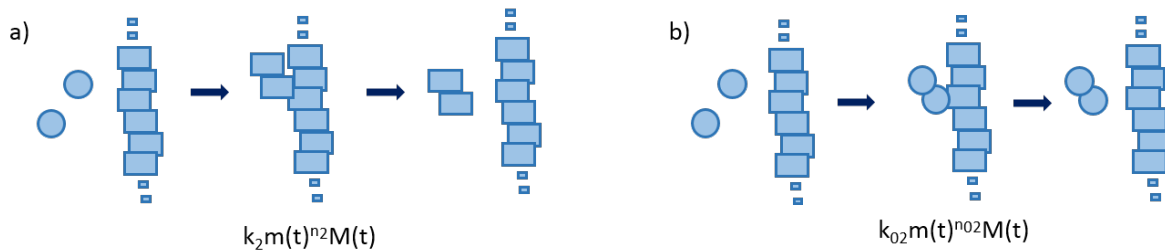


Abbildung 2.13.: **Sekundäre Keimbildung** Entstehung eines kritischen Keims an der Oberfläche einer vorhandenen Fibrille mit (a) oder ohne (b) Konversion des Keims hin zu  $\beta$ -Struktur.

Auch hier wird in der jüngsten Modellversion wieder sorgfältig zwischen der eigentlichen Sekundärkeimbildung, beschrieben durch die Parameter

- $k_{02}$  ... Rate, mit der sich Monomere zu einem sekundären Oligomerkeim zusammenlagern
- $n_{02}$  ... Reaktionsordnung der Sekundärkeimbildung

und dem Konversionsschritt unterschieden. Es folgt also für die sekundäre Keimbildung

$$k_{sec} = k_{02} m_{tot}^{n_{02}} M(t) := \alpha_2 M(t) \quad (2.29)$$



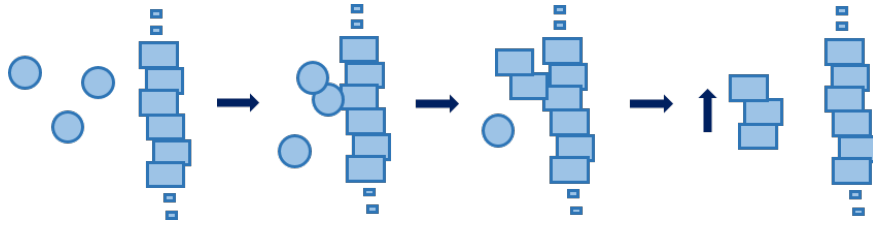


Abbildung 2.14.: **Entstehung einer Fibrille durch sekundäre Keimbildung** Unter Berücksichtigung eines expliziten Konversionsschrittes entsteht zunächst ein globuläres Oligomer an der Oberfläche einer Fibrille, das dann  $\beta$ -Stränge ausbildet und anschließend durch Elongation wächst. Eine Alternative wäre eine Umwandlung des Oligomers erst in Lösung statt an der Fibrilloberfläche (vgl. bspw. [58]).

Der gesamte Prozess der Entstehung neuer Fibrillen durch sekundäre Keimbildung setzt sich dann aus der initialen Keimbildung, der Konversion und der anschließenden Elongation zusammen (vgl. Abb. 2.14). Die effektive Rate  $\bar{\kappa}$ , die diesen Prozess beschreibt, lässt sich als

$$\bar{\kappa} = \left( 2k_+ k_{02} k_{conv} m_{tot}^{n_{02} + n_{conv} + 1} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.30)$$

schreiben. [27, 26]

Im hier beschriebenen Modell wird für die Konformationsänderung eines in Lösung befindlichen Oligomers und eines an der Oberfläche einer Fibrille entstehenden Oligomers dieselbe Geschwindigkeitskonstante  $k_{conv}$  angenommen. Es wäre aber möglich, dass bei der Sekundärkeimbildung das Vorhandensein einer  $\beta$ -Faltblattstruktur in direkter Nachbarschaft zum Oligomer zu einer beschleunigten Konformationsänderung führt. Dann müsste zwischen zwei unterschiedlichen Konversionsraten  $k_{conv,1}$  und  $k_{conv,2}$  differenziert werden.

Primär oder sekundär entstandene Oligomere können auch dissoziieren (vgl. Abb. 2.15), statt zur Fibrillenbildung beizutragen. Dieser Vorgang kann durch

$$k_{diss} = (k_{d1} + k_{d2}M(t))S(t) =: \rho_d S(t) \quad (2.31)$$

ausgedrückt wurden, wobei  $k_{d1}$  und  $k_{d2}M(t)$  jeweils die Dissoziationsraten für primär bzw. sekundär entstandene Oligomere bezeichnen, und  $\rho_d = (k_{d1} + k_{d2}M(t))$  die Gesamtdissoziationsrate ist. Die Gesamtrate der Verarmung der Population globulärer Oligomere entweder durch Konversion in fibrilläre Aggregate oder Dissoziation lässt sich dann als

$$k_{olig} = (k_{d1} + k_{d2}M(t) + k_{conv}m(t)^{n_{conv}})S(t) = (\rho_d(t) + \rho_c(t))S(t) =: \rho_e(t)S(t) \quad (2.32)$$

schreiben. [26]

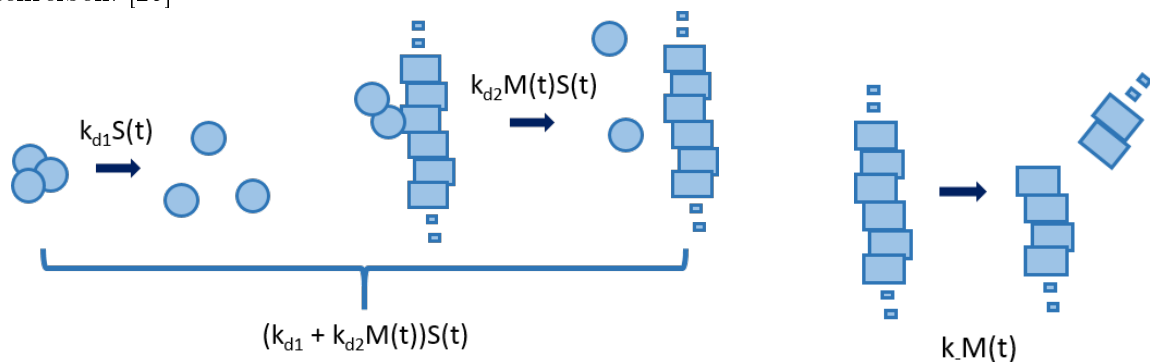


Abbildung 2.15.: **Dissoziation von Oligomeren** Statt zur Bildung von Fibrillen beizutragen, können durch primäre oder sekundäre Keimbildung entstandene Oligomere auch wieder dissoziieren. Bei einer Größe unterhalb der kritischen Keimgröße ist dieses Szenario thermodynamisch favorisiert.

Abbildung 2.16.: **Fragmentation** Durch Entzweibrechen einer vorhandenen Fibrille entstehen zwei neue Enden, die der Elongation zur Verfügung stehen, sodass der Fibrillierungsprozess beschleunigt wird.

Eine weitere Möglichkeit der Bildung neuer Fibrillen stellt die Fragmentation dar, bei der eine vorhandene Fibrille, oft unter dem Einfluss äußeren Schüttelns [54], entzwei bricht und so eine neue Fibrille mit zwei weiteren Enden, die der Monomeraddition zur Verfügung stehen, entsteht (vgl. Abb. 2.16). Für sie gilt [26]:

$$k_{frag} = k_- M(t) =: \gamma M(t) \quad (2.33)$$

### Zusammenführung zu einem Modell des gesamten Aggregationsprozesses nach *Dobson, Knowles und Linse*

Um aus diesen Einzelansätzen für die verschiedenen Prozesse einen Verlauf der Konzentrationen der verschiedenen an der Aggregation beteiligten Spezies zu erhalten, werden als erstes Differentialgleichungen für ihre zeitliche Änderung im *early-time-limit* aufgestellt, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem  $m(t) \approx m_{tot}$  noch gilt. Dazu werden alle in den Gleichungen 2.20 bis 2.33 aufgestellten Prozesse, die zu einer vermehrten oder verringerten Population einer Spezies beitragen, addiert. Damit erhält man unter Berücksichtigung des Konversionsschrittes ein System differentialer Gleichungen der folgenden Form [26]:

$$\frac{dS_0(t)}{dt} = \alpha_1 + \alpha_2 M_0(t) - \rho_e S_0(t) \quad (2.34a)$$

$$\frac{dP_0(t)}{dt} = \rho_c(t) S_0(t) + \gamma M_0(t) \quad (2.34b)$$

$$\frac{dM_0(t)}{dt} = \mu P_0(t) \quad (2.34c)$$

Die gemeinsame Betrachtung von Fragmentation und Sekundärkeimbildung liefert bei Mitbeachtung des Konversionsschrittes und möglicher Oligomere allerdings sehr komplexe Lösungen, sodass in der Literatur keine allgemeine Lösung gegeben, sondern nur entweder Fragmentation oder Sekundärkeimbildung einbezogen wird. Der für diese Arbeit aufgrund der gewählten Aggregationsbedingungen relevante Fall ist derjenige mit Sekundärkeimbildung (für eine Lösung unter Einbeziehung von Fragmentation ohne Betrachtung der Sekundärkeimbildung s. [26]). Dann vereinfacht sich das Differentialgleichungssystem im Grenzfall geringer Aggregationszeiten zu

$$\frac{dS_0(t)}{dt} = \alpha_1 + \alpha_2 M_0(t) - \rho_e(0) S_0(t) \quad (2.35a)$$

$$\frac{dP_0(t)}{dt} = \rho_c(0) S_0(t) \quad (2.35b)$$

$$\frac{dM_0(t)}{dt} = \mu P_0(t) \quad (2.35c)$$

Dieses Gleichungssystem lässt sich äquivalent als

$$\begin{pmatrix} \frac{dS_0(t)}{dt} \\ \frac{dP_0(t)}{dt} \\ \frac{dM_0(t)}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\rho_e & 0 & \alpha_2 \\ \rho_c & 0 & 0 \\ 0 & \mu & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ P_0(t) \\ M_0(t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.36)$$

schreiben und entspricht damit einer Differentialgleichung der Form

$$\frac{d\vec{x}(t)}{dt} = \mathbf{A}(\mathbf{t})\vec{x}(t) + \vec{b}(t) \quad (2.37)$$

Aus ihrer Lösung ergibt sich für das zeitabhängige Verhalten der Konzentrationen von Oligomeren, Fibrillen und in Fibrillen eingebauten Monomeren zu Beginn der Aggregation [27]:

$$S_0(t) = \frac{\alpha_1}{3\bar{\kappa}} (\exp(\bar{\kappa}t) - 1) \quad (2.38a)$$

$$P_0(t) = \frac{\alpha_1 \rho_c}{3\bar{\kappa}} (\exp(\bar{\kappa}t) - 1) \quad (2.38b)$$

$$M_0(t) = \frac{\lambda^3}{3\bar{\kappa}} (\exp(\bar{\kappa}t) - 1) \quad (2.38c)$$

Im experimentellen Kontext ist besonders das zeitabhängige Verhalten der Gewichtskonzentration der Fibrillen  $M(t)$  über den gesamten Aggregationszeitraum der Messung interessant, da dies meist die Observable ist, beispielsweise bei Thioflavin T Assays (vgl. Kap. 3.4). Mit Gleichung 2.38c) und der Annahme, dass  $M(\infty) \approx m_{tot}$  gilt, folgt für  $M(t)$  [27]:

$$\frac{M(t)}{m_{tot}} = \frac{\frac{M_0(t)}{m_{tot}}}{1 + \frac{M_0(t)}{m_{tot}}} \approx \frac{\frac{\lambda^3}{3\bar{\kappa}} (\exp(\bar{\kappa}t) - 1)}{1 + \frac{\lambda^3}{3\bar{\kappa}} (\exp(\bar{\kappa}t) - 1)} \quad (2.39)$$

Im Fall einer *One-Step-Nucleation* ohne explizite Berücksichtigung eines Konversionsschrittes oder globulärer Oligomere erhält man mit einem äquivalenten Ansatz [61]:

$$\frac{M(t)}{m_{tot}} = \frac{\frac{\lambda^2}{2\kappa^2} (\exp(\kappa t) - 1)}{1 + \frac{\lambda^2}{2\kappa^2} (\exp(\kappa t) - 1)} \quad (2.40)$$

Abbildung 2.17 zeigt beispielhafte Verläufe der Aggregation jeweils mit und ohne explizite Berücksichtigung von Oligomeren unter Variation einer Rate.

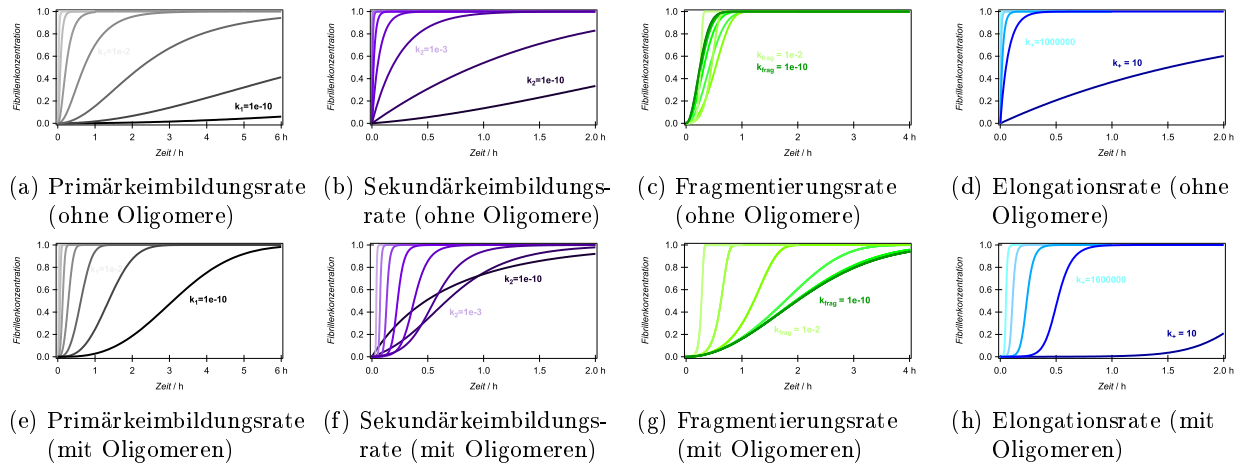


Abbildung 2.17.: **Einfluss von Ratenvariationen auf den Aggregationsverlauf** Dargestellt sind die ratenabhängigen Verläufe mit und ohne Berücksichtigung von Oligomeren unter Variation der Primärkeimbildungsrate (a und e) ohne Berücksichtigung von Sekundärprozessen, der Sekundärkeimbildungsrate (b und f), der Fragmentierungsrate (c und g) sowie der Elongationsrate (d und e) unter Berücksichtigung von Primär- und Sekundärkeimbildung aber ohne Einschluss der Fragmentierung. Grundlage für die Berechnung der Aggregationsverläufe sind die in diesem Abschnitt diskutierten Modelle von *Meisl et al.* [56], *Michaels et al.* [27] und *Dear et al.* [26]. Dabei wurden, sofern nicht variiert, folgende Parameter gewählt:  $m_0 = 40 \mu\text{M}$ ,  $n_{01} = 1$ ,  $n_{02} = 2$ ,  $n_{conv} = 2$ ,  $k_+ = 11000 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,  $k_{conv} = 0.033 \mu\text{M}^{-2}\text{h}^{-1}$ ,  $k_{01} = 1e-8 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,  $k_{02} = 1e-6 \mu\text{M}^{-2}\text{h}^{-1}$ .

### Abhängigkeit der Lag- und Halbwertszeit von der initialen Monomerkonzentration

Auf Grundlage des oben diskutierten *One-Step-Nucleation*-Modells der Gruppen *Dobson, Knowles* und *Linse* zur Beschreibung der Aggregation von Proteinen kann die Konzentrationsabhängigkeit

der Lag- oder Halbwertszeit der Aggregation zur Bestimmung der kritischen Keime  $n_1$  und  $n_2$  der Primär- bzw. Sekundärnukleation genutzt werden. Für die Lag-Zeit, d.h. die Zeit zwischen Beginn des Aggregationsprozess und einem starken Anstieg der Fibrillenmasse, geprägt durch die massive Entstehung neuer Fibrillen, gelten demnach - abhängig vom dominierenden mikroskopischen Prozess - die folgenden Abhängigkeiten von der Anfangskonzentration der Monomere  $m_0$  [54]:

- primäre homogene Keimbildung:

$$t_{lag} \propto m_0^{-\frac{n_1}{2}} \quad (2.41)$$

- sekundäre Keimbildung:

$$t_{lag} \propto m_0^{-\frac{n_2+1}{2}} \quad (2.42)$$

- Fragmentierung:

$$t_{lag} \propto m_0^{-\frac{1}{2}} \quad (2.43)$$

Der Ausdruck für die Fragmentierung ergibt sich dabei aus der Proportionalität für die Sekundärnukleation unter der Annahme, dass  $n_2 = 0$  ist, da es sich um einen Sekundärprozess handelt, der unabhängig von der Bildung eines neuen Aggregatkeims ist. Da die Lag-Zeit nicht eindeutig definiert ist und aufgrund eines schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses der Daten im Bereich der Lag-Phase schwierig zu bestimmen sein kann (s. auch Kap. 3.4.4), wird von *Cohen et al.* [54] statt der Lag- die Halbwertszeit zur Determinierung der Keimgröße verwendet, wobei die genutzten Proportionalitäten identisch mit in den Gleichungen 2.41-2.43 aufgeführten sind.

### Amyloidbildung nach *Dovidchenko et al.*

Demgegenüber betrachten *Dovidchenko et al.* [62, 63] die Übergangszeit  $T_2$  und das Verhältnis zwischen ihr und der Lagzeit,  $L_{rel} = \frac{t_{lag}}{T_2}$ , als die entscheidenden Kenngrößen zur Bestimmung eines kritischen Keims.

Ausgangspunkt für ihr Modell sind ebenfalls zeitabhängige Ratengleichungen, um das Reaktionsverhalten der verschiedenen während der Fibrillierung vertretenen Spezies zu beschreiben. Dabei beschränken sie sich zunächst auf die Konzentration freier Fibrillenenden  $P_{end}$  und die Konzentration freier Monomere  $m$ . Weiterhin unterscheiden sie zwischen dem thermodynamischen kritischen Keim  $n_1$  bzw.  $n_2$  für Primär- bzw. Sekundärkeimbildung und dem *seed* der Größe  $n_s$ , der dasjenige kleinste Aggregat bezeichnet, von dem aus stabil das Fibrillenwachstum startet, da die Polymerisationsreaktion dann energetisch favorisiert, weil jede Monomeranlagerung die Gibbs'sche freie Energie weiter reduziert (vgl. Abb. 2.18). [62]

Im Fall der Primärkeimbildung kann das Aggregationssystem dann durch

$$\frac{dP_{end}(t)}{dt} = 2k_1 n_s m(t)^{n_1} \quad (2.44a)$$

$$\frac{dm(t)}{dt} = -k_1 n_s m(t)^{n_1} - k_+ P_{end}(t) m(t) \quad (2.44b)$$

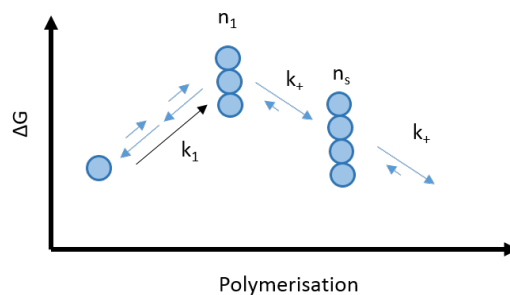


Abbildung 2.18.: **Schematische Darstellung der Fibrillenbildung durch homogene primäre Prozesse nach *Dovidchenko et al.*** Monomere lagern sich zunächst zu einem primären Keim  $n_1$  zusammen, der den thermodynamisch am wenigsten stabilen Zustand darstellt. Durch Anlagerung weiterer Monomere entsteht ein *seed* der Größe  $n_s$ , der Ausgangspunkt für fibrilläres Wachstum durch Elongation ist.

beschrieben werden, wobei  $k_1$  die Rate der Primärkeimbildung und  $k_+$  die Rate der Elongation ist. Dieses Gleichungssystem lässt sich durch

$$\frac{m(t)}{m_0} = \frac{4^{1/n_1} \exp(t/T)}{(1 + \exp(-n_1 t/T))^{n_1/2}} \quad (2.45)$$

lösen. Dabei stellt  $T$  die charakteristische Zeitspanne der Monomerverarmung für  $t \rightarrow \infty$  dar. Mit der Konzentration  $M$  der in einer Fibrille gebundenen Monomere, gegeben durch

$$M(t) = 1 - \frac{m(t)}{m_0} \quad (2.46)$$

und der Rate  $\omega(t)$ , mit der Monomere in eine Fibrille integriert werden, d.h.

$$\omega(t) = \frac{dM(t)}{dt} \quad (2.47)$$

folgt dann für die Übergangszeit  $T_2$ , d.h. die Zeitspanne stark beschleunigten Wachstums der Fibrillenmasse (s. auch Abschnitt 3.4.4 für eine schematische Darstellung), die Lagzeit  $t_{lag}$  und das Verhältnis  $L_{rel}$  für das Verhältnis zwischen Übergangs- und Lagzeit

$$T_2 = \frac{1}{\omega_{max}} \quad (2.48a)$$

$$t_{lag} = t_{\omega_{max}} - \frac{M(t_{\omega_{max}})}{\omega_{max}} \quad (2.48b)$$

$$L_{rel} = t_{lag}/T_2 = t_{lag}\omega_{max} \quad (2.48c)$$

wobei  $\omega_{max}$  die maximal für das Wachstum der Fibrillenmasse  $M(t)$  erreichte Rate  $\omega(t)$  ist und  $t_{\omega_{max}}$  der Zeitpunkt, zu dem sie erreicht wird. [62]

### Herleitung der kritischen Keimgröße aus der Konzentrationsabhängigkeit von $T_2$ und $L_{rel}$

Dominiert primäre homogene Keimbildung, gefolgt von linearem Wachsen, ergibt sich die Größe des kritischen Keims der Primärkeimbildung dann aus [62]:

$$n_1 = -\frac{d(\ln T_2)}{d(\ln m_0)} \quad (2.49)$$

Von einem solchen Fall kann laut *Dovidchenko et al.* ausgegangen werden, wenn  $L_{rel}$  nicht von der Konzentration abhängt und  $L_{rel} < 0.2$  gilt. Sind hingegen andere Prozesse - etwa Sekundärnukleation oder Fragmentierung - entscheidend an der Proteinaggregation beteiligt, gilt - von analogen Ratengleichungen ausgehend (für Details s. [62]):

$$n_1 = 1 + n_2 - \frac{d(L_{rel})}{d(\ln m_0)} \quad (2.50)$$

$$n_2 = -1 - 2 \frac{d(\ln T_2)}{d(\ln m_0)} \quad (2.51)$$

Im Fall von Fragmentierung existiert kein Sekundärkeim, sodass sich der Ausdruck für den primären kritischen Keim  $n_1$  wiederum aus den für Sekundärprozesse aufgeführten Gleichungen 2.50-2.51 unter der Annahme, dass  $n_2 = 0$  ist, ergibt. [63]

Folgt man den Annahmen von *Dovidchenko et al.*, ist die Übertragung der Konzentrationsabhängigkeiten der Lag-Zeit auf die Halbwertszeit, wie sie von *Cohen et al.* vorgenommen wird, nur im Fall der primären Keimbildung zulässig, da sich mit dem Verhältnis zwischen Übergangs- und Lag-Zeit auch das zwischen Übergangs- und Halbwertszeit ändern muss. Ist das Vorgehen von *Cohen et al.* korrekt, bedeutet das umgekehrt, dass die von *Dovidchenko et al.* vorgeschlagenen neuen Parameter zur Bestimmung der kritischen Keimgröße nicht geeignet sind. Beide erhalten allerdings im Fall von A $\beta$ 42 für den kritischen Keim der Sekundärnukleation  $n_1 = 2$  (vgl. [54, 63]), kommen also trotz unterschiedlicher Ansätze auf das gleiche Resultat.

### 2.3. Das Amyloid- $\beta$ -Peptid

Die Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Peptids spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Alzheimer [64]. Es entsteht körpereigen durch Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP): Zwei Enzyme -  $\beta$ -Sekretase und  $\gamma$ -Sekretase - kreieren durch Abspaltung 39 bis 43 Aminosäuren lange Fragmente (vgl. Abb. 2.19) [65]. Die beiden wichtigsten und häufigsten Formen des Amyloid- $\beta$ -Peptids sind



Abbildung 2.19.: **Produktion des A $\beta$ -Peptids durch Spaltung von APP**  $\beta$ -Sekretase und  $\gamma$ -Sekretase spalten das A $\beta$ -Fragment vom Amyloid-Precursor-Protein ab. Polare Aminosäuren innerhalb des Fragments wurden grün gekennzeichnet, basische blau und saure rot.

dabei A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42<sup>1</sup>; ersteres wird häufiger produziert, zweiteres fibrilliert schneller und effizienter und weist eine deutlich höhere Neurotoxizität auf, sodass es vermutlich die für die Entwicklung von Alzheimer relevante Spezies ist [66]. Auch die resultierenden Fibrillenstrukturen unterscheiden sich: Während A $\beta$ 40 einzelne  $\beta$ -hairpins bildet, die sich innerhalb der Fibrille auf unterschiedliche Weise zusammenlagern können, formt A $\beta$ 42 s-förmige Doppel- $\beta$ -hairpins (vgl. Abb. 2.20) [67, 68].

Das A $\beta$ -Peptid kann sowohl rekombinant gewonnen als auch synthetisch hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde synthetisch hergestelltes A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 verwendet, da dieses innerhalb des Forschungsprojekts bereits etabliert war und durch die Verwendung gleicher Peptide und Protokolle eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse trotz unterschiedlicher mitwirkender Forschungsgruppen mit jeweils eigenen Methoden zu erzielt werden sollte. Obwohl rekombinantes und synthetisches Amyloid- $\beta$  die gleiche Aminosäuresequenz aufweisen, unterscheidet sich das Aggregationsverhalten. *Finder et al.* zeigten, dass rekombinantes A $\beta$ 42 unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, 37 °C, 122  $\mu$ M NaCl) etwa dreimal so schnell fibrilliert wie synthetisches und dabei sowohl ein besser reproduzierbares Aggregationsverhalten zeigt als auch deutlich homogenere, weniger verzweigte Fibrillen bildet; darüber hinaus

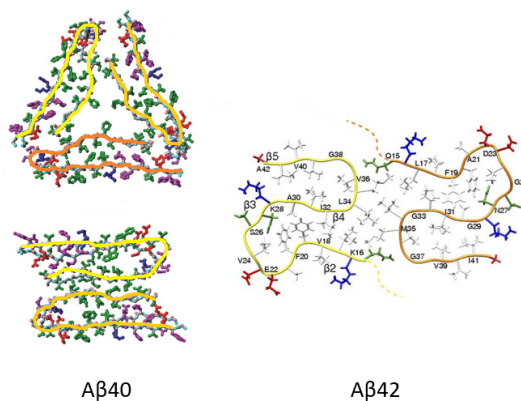


Abbildung 2.20.: **Struktur von A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Fibrillen** A $\beta$ 40 bildet einzelne  $\beta$ -hairpins, die sich paarweise oder dreifach zusammenlagern, A $\beta$ 42 hingegen s-förmige Doppel- $\beta$ -hairpins. Adaptiert nach [67, 68].

ist auch die Neurotoxizität des rekombinanten Amyloid- $\beta$ s gegenüber dem synthetischen deutlich erhöht [69]. Diese Differenz wird auf das Vorhandensein von etwa 3.5% D-Aminosäuren, d.h. Aminosäuren mit rechtshändiger Anordnung von Carboxyl- und Aminogruppe, in synthetisch hergestelltem A $\beta$ 42 zurückgeführt, wohingegen in rekombinant gewonnenem Amyloid- $\beta$ 42 nur die linkshändigen L-Aminosäuren zu finden seien [69]. Dies betreffe je Peptid allerdings nur ein bis zwei Aminosäuren. Denkbar wäre auch, dass minimale Rückstände des Herstellungsprozesses - etwa DNA-Fragmente bei rekombinanten A $\beta$  oder Trifluoroessigsäure (TFA) und Dimethylsulfoxid (DMSO) bei synthetischem A $\beta$  - zu dem veränderten Aggregationsverhalten führen.

<sup>1</sup>In der Literatur werden diese Peptide oftmals mit A $\beta$ <sub>1-40</sub> bzw. A $\beta$ <sub>1-42</sub> bezeichnet, um die genaue Sequenz zu indizieren. Ein zusätzliches WT für Wildtyp gibt zudem an, dass es sich um die ursprüngliche Aminosäuresequenz handelt, wie sie vom menschlichen Körper produziert wird. Sofern nicht explizit anders angegeben, bezeichnen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in dieser Arbeit immer den Wildtyp von A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

## 3. Experimentelles

### 3.1. Probenmaterial und Präparation von Aggregationslösungen

#### 3.1.1. Verwendete A $\beta$ -Peptide

In dieser Arbeit wurden sowohl unmarkierte (s. Tabelle 3.1) als auch fluoreszenz-markierte A $\beta$ -Peptide (s. Tabelle 3.2) untersucht; neben den Wildtypen von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 (A $\beta$ 40WT, A $\beta$ 42WT) kamen dabei auch je zwei Varianten, bei denen eine Aminosäure durch Prolin ersetzt wurde, zum Einsatz (A $\beta$ 40E22P, A $\beta$ 40G37P, A $\beta$ 42E22P, A $\beta$ 42G37P). Überdies wurde für Farbstoffmarkierungen (s. unten) auch eine A $\beta$ 40-Variante mit einem zusätzlichen Cystein am N-Terminus benötigt. Alle nicht markierten Peptide wurden von der Core Unit of Peptide Technologies der Universität Leipzig synthetisiert, purifiziert und in lyophilisierter Form bezogen.

Probenkürzel	Aminosäuresequenz
A $\beta$ 40WT	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV
A $\beta$ 40E22P	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF <b>AP</b> DVGSNKGA IIGLMVGGVV
A $\beta$ 40G37P	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMV <b>P</b> GVV
C-A $\beta$ 40	<b>C</b> DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV
A $\beta$ 42WT	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA
A $\beta$ 42E22P	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF <b>AP</b> DVGSNKGA IIGLMVGGVV IA
A $\beta$ 42G37P	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMV <b>P</b> GVV IA

Tabelle 3.1.: **Übersicht der unmarkierten A $\beta$ -Peptide, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden**  
Blau und fett gekennzeichnet sind jeweils die Veränderungen der Varianten gegenüber dem Wildtyp.

In Kapitel 4 wird der Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren analysiert. Hierfür wurden unterschiedlichen am N-Terminus markierte A $\beta$ 40-Peptide miteinander verglichen. HiLyte488-A $\beta$ 40 und HiLyte647-A $\beta$  wurden als fertig gelabelte Peptide mit einem Reinheitsgrad von mehr als 95 % gekauft (Anaspec, Fremont, USA). Mit Atto488 markiertes A $\beta$ 40 wurde ebenso wie genauso gelabeltes A $\beta$ 40E22P, A $\beta$ 40G37P, A $\beta$ 42, A $\beta$ 42E22P und A $\beta$ 42G37P sowie Atto594-A $\beta$ 42 von der Core Unit of Peptide Technologies der Universität Leipzig durch Maleimid-Markierung, Carboxy-Markierung oder Click-Chemie mit einem Reinheitsgrad >98% hergestellt. Im Gegensatz dazu wurden Atto647N-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 selbst gelabelt:

**Estermarkierung:** Um A $\beta$ 40 mit Atto647N zu labeln, wurde es mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit pH 8.3 gelöst und anschließend mit zu 17.5 mg/ml in DMSO gelösten Atto647N-NHS-Ester gemischt. Diese Lösung wurde dann für 90 min bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt und anschließend das markierte Atto647N-A $\beta$ 40 mittels einer PD Minitrap G25 Säule (GE Healthcare, Waukesha, USA) von dem überschüssigem Farbstoff getrennt.

**Maleimid-Markierung:** Für Atto655-A $\beta$ 40 wurde mit einer Maleimid-Markierung gearbeitet. Dazu wurde C-A $\beta$ 40 zunächst in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit pH 9.2, der 1 mM TCEP (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) enthielt, gelöst, um Disulfid-Brücken zu brechen, und im Vakuum bei 200-250 mbar gegen den gleichen Puffer ohne TCEP bei pH 7.5 dialysiert. Anschlie-

KAPITEL 3. EXPERIMENTELLES

ßend wurde Atto655 mit einem molaren Überschuss von 1.3:1 hinzugegeben und die Lösung zwei Stunden lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Aufreinigung wurde wie bei Atto647N-Aβ40 eine PD Minitrap G25 Säule verwendet.

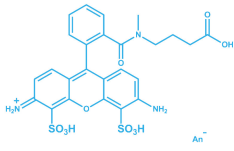
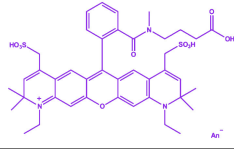
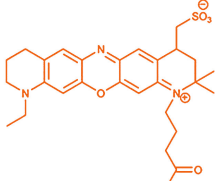
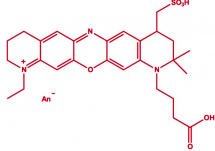

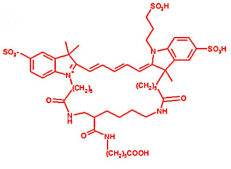
Probenkürzel	markiert von	Strukturformel des Fluorophors
Atto488-Aβ40	Core Unit of Peptide Technology, Universität Leipzig	
Atto488-Aβ40E22P	Core Unit of Peptide Technology, Universität Leipzig	
Atto488-Aβ40G37P	Core Unit of Peptide Technology, Universität Leipzig	
Atto488-Aβ42	Core Unit of Peptide Technology, Universität Leipzig	
Atto594-Aβ42	Core Unit of Peptide Technology, Universität Leipzig	
Atto647N-Aβ40	selbst gelabelt	
Atto655-Aβ40	selbst gelabelt	
HL488-Aβ40	Anaspec, Fremont, USA	
HL647-Aβ40	Anaspec, Fremont, USA	

Tabelle 3.2.: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten markierten Aβ-Peptide Die dargestellten Strukturformeln der Atto-Fluorophore können beim Hersteller auf [www.atto-tec.com](http://www.atto-tec.com) abgerufen werden, die für HL488 und HL647 wurden von [70] und [71] adaptiert.



### 3.1.2. Herstellung von Aggregationslösungen

Um den Fibrillierungsprozess von A $\beta$ -Peptiden und dabei insbesondere auch frühe Aggregatzustände und -mechanismen beobachten zu können, wurde das pulverförmig vorliegende Peptid zunächst in basischem Milieu gelöst und anschließend unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Dabei wurde zunächst nach einem bereits bekannten Protokoll von *Adler et al.* [20] vorgegangen, allerdings zugunsten einer besseren Löslichkeit während der Dialyse bei pH 7.5 gearbeitet und auf die Zugabe von Natriumazid verzichtet:

Zunächst wird A $\beta$  in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid bei pH 9.2 gelöst und anschließend entweder vier Stunden lang mit einem MWCO (engl. *molecular weight cut-off*) von 1000 gegen den gleichen Puffer bei pH 7.5 dialysiert oder mindestens 1:5 im gleichen Puffer bei niedrigerem pH-Wert gelöst, um einen finalen pH-Wert von pH 7.5 zu erreichen. Anschließend wird die Lösung bei 37°C unter Schütteln mit 400 rpm für 24 h inkubiert. Alle in Kapitel 4 gezeigten Messungen entstanden auf Grundlage von A $\beta$ -Proben, die nach diesem Protokoll aggregiert wurden. Es wird im Folgenden *pH9-Protokoll* genannt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit (vgl. Kap. 5) wurde zusätzlich ein Protokoll etabliert, bei dem Amyloid- $\beta$  nicht in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid bei pH 9.2, sondern in 3.8-facher Konzentration in 60 mM Natriumhydroxid gelöst wird und anschließend im Verhältnis 1:3.8 in Natriumphosphatpuffer mit 204 mM Natriumchlorid bei pH 6 verdünnt. Die daraus resultierende finale Lösung weist dann einen Salzgehalt von 150 mM Natriumchlorid und einen pH-Wert von 7.4 auf. Für Konzentrationsserien, wie sie beispielsweise für Fibrillierungsassays hergestellt wurden, wurde auf diese Weise die Probe mit der höchsten Konzentration hergestellt, und die niedrigeren Konzentrationen durch weitere Verdünnung in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid bei pH 7.4 erreicht. Darüber hinaus wurden die Inkubationsbedingungen variiert, insbesondere wurde auch ohne Schütteln und zusätzlich bei Raumtemperatur aggregiert. Eine Diskussion des Einflusses der unterschiedlichen Aggregationsbedingungen auf den Fibrillierungsprozess findet sich in Kapitel 5.2. Dort wird dieses Protokoll als *pH13-Protokoll* bezeichnet.

## 3.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht das Studium von Diffusionskinetiken, Bindungsmechanismen oder Aggregationsprozessen von Peptiden, Proteinen oder Polymeren, indem sie mit einem oder mehreren sogenannten Fluorophoren markiert werden, deren Emissionsverhalten detektiert wird. Elektromagnetische Strahlung mit zu den spezifischen Fluorophoren passender Wellenlänge regt dazu die Fluorophore so an, dass sie vom Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand wechseln. Dann wird das anschließend bei der Relaxation zurück in den Grundzustand emittierte Licht, genannt Fluoreszenz, detektiert. [16] Dieses Prinzip bildet die Grundlage auch komplexerer experimenteller Methoden wie z.B. zeitaufgelösten Anisotropiemessungen (TRFA) [72], Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) [73], Förster-Resonanz-Energietransfer-Messungen (FRET) [74] oder Zwei-Farben-Koinzidenz-Messungen (TCCD) [75].

Eine wichtige Weiterentwicklung des bereits 1904 erfundenen Fluoreszenzmikroskops stellte die Nutzung der in den 1950er Jahren von Marvin Minsky eingeführten konfokalen Mikroskopie [76] dar. Durch das geringe Beobachtungsvolumen ermöglicht die konfokale Mikroskopie Fluoreszenzspektroskopie-Messungen auf Einzelmolekül-Niveau. Anders als Ensemble-Messungen zeigen Einzelmolekülmessungen nicht bloß das statistische Mittel des interessierenden Messwerts, sondern bilden dessen Verteilung ab. Dies ist insbesondere bei stark heterogenen Prozessen von Interesse. Eine erste Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messung wurde bereits 1976 publiziert, wobei das Molekül jedoch noch mit mehreren Fluorophoren markiert war [77]. In den 1980er-Jahren wurde erstmals konfokale Mikroskopie für fluoreszierende Präparate eingesetzt [78]. Seither verfeinerte sich die (Einzelmolekül-) Fluoreszenzspektroskopie mittels verbesserter mikroskopischer Techniken und durch den Einsatz leistungstärkerer und stabilerer Laser sowie qualitativ hochwertiger optischer

und elektronischer Bauelemente beständig [79, 80, 81].

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen verwendet, um über die Analyse von einzelnen Peptiden bzw. Peptidaggregaten zugeordneten Bursts Oligomerverteilungen abzubilden. Bursts bezeichnen dabei innerhalb der Messdaten zu beobachtende zeitlich begrenzte stark erhöhte Photonendichten aufgrund der Diffusion einzelner Moleküle durch das Messvolumen. In Kapitel 3.3 wird die im Rahmen dieser Arbeit dafür entwickelte und programmierte Analyseroutine vorgestellt. In den folgenden Abschnitten werden nun zunächst die der Fluoreszenzspektroskopie zugrunde liegenden physikalischen und methodischen Prinzipien erläutert (s. Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2) und im Abschnitt 3.2.3 der experimentelle Aufbau vorgestellt. Anschließend werden mit Anisotropie- und FCS-Messungen zwei wichtige experimentelle Techniken der Fluoreszenzspektroskopie dargelegt (s. Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5).

### 3.2.1. Fluorophore und Fluoreszenzübergänge

Als Fluorophore werden Moleküle bezeichnet, die Licht einer bestimmten Wellenlänge,  $\lambda_{abs}$ , absorbieren und es bei einer spezifischen anderen Wellenlänge,  $\lambda_{em}$ , wieder emittieren, wobei die Emissionswellenlänge sowohl vom Fluorophor als auch seiner chemischen Umgebung abhängt. Verglichen mit atomaren Spektrallinien sind die Absorptions- und Emissionslinien dabei deutlich verbreitert, da Moleküle aus einer Vielzahl vibrierender Atome bestehen. Alle Fluorophore, die Licht im sichtbaren Bereich absorbieren, besitzen mehrere konjugierte C-C-Doppelbindungen, oftmals in Form von aromatischen Ringen. [82]

In einem System aus mehreren Doppelbindungen bilden deren  $\pi$ -Orbitale ein gemeinsames Molekülorbital, in dem sich mehrere delokalisierte  $\pi$ -Elektronen befinden, die sich frei entlang der Kohlenwasserstoffatome bewegen können. Sie können bereits von Photonen geringerer Energie, entsprechend einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich, in einen angeregten Zustand überführt werden. [82]

Klassisch können Fluorophore als aus mehreren schwingenden Elektronen zusammengesetzte elektrische Dipole betrachtet werden, die Licht dann absorbieren, wenn dessen Frequenz der eigenen charakteristischen Wellenlänge entspricht. Wie stark ein Molekül Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, wird durch die Oszillatorstärke bestimmt. Sie kann als Maß dafür gesehen werden, wie viele Elektronen des Moleküls mit der Frequenz des einfallenden Lichts schwingen. Ein Übergang des Moleküls in einen anderen Zustand ist dann erlaubt, wenn die Oszillatorstärke, gegeben durch

$$f = \frac{2303m_e c}{\pi N_A e^2 n} \int \epsilon(\nu) d\nu = \frac{4.32 \times 10^{-9}}{n} \epsilon(\nu) d\nu \quad (3.1)$$

den Wert 1 hat. In dieser Gleichung ist  $m_e$  die Masse eines Elektrons und  $e$  seine Ladung,  $c$  entspricht der Lichtgeschwindigkeit,  $N_A$  der Avogadrokonstanten,  $n$  dem Brechungsindex des Mediums und  $\epsilon(\nu)$  stellt den frequenzabhängigen Extinktionskoeffizienten dar. [83]

Quantenmechanisch wird der Übergang zwischen zwei Zuständen durch das Übergangsdipolmoment

$$\mu_{GA} = \int \psi_G \mu \psi_A d\nu \quad (3.2)$$

beschrieben, wobei  $\psi_G$  den Grundzustand darstellt und  $\psi_A$  den angeregten Zustand. [82]

Photonen mit einer Wellenlänge von weniger als 200 nm können Moleküle ionisieren und damit photochemisch zersetzen. Übergänge in Molekülen mit geringer Energiedifferenz zwischen erstem angeregten und Grundzustand finden hingegen häufig durch nicht-strahlende interne Konversion statt, sodass die Fluoreszenzintensität deutlich verringert wird. Deshalb absorbieren und emittieren die meisten photochemisch stabilen und hellen Fluorophore Licht mit einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 700 nm. [82]

Als Fluoreszenz wird das emittierte Licht dabei nur bezeichnet, wenn es einem Übergang vom ersten angeregten Singulettzustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  entstammt; beim Übergang vom

Triplett- in den Singulett-Grundzustand spricht man aufgrund der langen Zeit zwischen Anregung und Emission von Phosphoreszenz.

Die während und zwischen Anregung und Relaxation stattfindenden Prozesse werden oftmals mittels eines Jablonski-Diagramms graphisch verdeutlicht (vgl. Abb. 3.1). Dabei werden in der Regel vereinfachend nur Singulett-Grundzustand  $S_0$ , erster angeregter Singulettzustand  $S_1$  und erster Triplettzustand  $T_1$  berücksichtigt.

Nach Anregung in den  $S_1$ -Zustand erfolgt meist zunächst ein Übergang auf das niedrigste Energielevel innerhalb des angeregten Zustand, z.B. durch interne Konversion (IC) mit einer Rate im Größenbereich von  $10^{10} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^{14} \text{ s}^{-1}$ . Dadurch weist das beim anschließenden Übergang in den  $S_0$ -Grundzustand emittierte Photon eine geringere Energie im Vergleich zum absorbierten Photon auf, was in eine Rotverschiebung des Emissionsspektrums hin zu größeren Wellenlängen resultiert, die sogenannte Stokesverschiebung. [82]

Die Rate des Fluoreszenzübergangs von angeregtem Singulettzustand in den Grundzustand  $S_0$  liegt typischerweise im Bereich von  $10^7 \text{ s}^{-1}$  bis  $10^9 \text{ s}^{-1}$ . Alternativ ist jedoch auch ein strahlungsloser Übergang möglich. Eine weitere Möglichkeit der Relaxation ist der Wechsel in den Triplettzustand  $T_1$  (ISC von engl. *inter system crossing*) mit anschließender Phosphoreszenz oder einem strahlungslosen Übergang in den Grundzustand. Gemäß dem Franck-Cordon-Prinzip finden Übergänge zwischen zwei Zuständen im Jablonski-Diagramm immer senkrecht statt, da der Elektronenübergang mit einer Dauer von ca.  $10^{-15} \text{ s}$  bedeutend schneller ist als Kernschwingungen mit einer Zeitskala von  $10^{-13} \text{ s}$ , sodass während des Übergangs keine räumliche Änderungen stattfinden. [82]

Aufgrund der oben beschriebenen alternativen Relaxationspfade durch interne Konversion werden in der Regel weniger Photonen emittiert als absorbiert. Das Verhältnis der Übergangsraten  $k_s$  für die Strahlung emittierenden und  $k_{ns}$  für die strahlungslosen Relaxationsvorgänge

$$\Phi_F = \frac{k_s}{k_s + k_{ns}} \quad (3.3)$$

beschreibt für den Übergang vom ersten angeregten Singulettzustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  die Quantenausbeute  $\Phi_F$ , die genau wie Absorptions- und Emissionsspektrum zu den charakteristischen Merkmalen eines Fluorophors gehört. Die beobachtbare Fluoreszenzintensität ist dann gegeben durch

$$I_F = \Phi_F k_A I_0 [F] \quad (3.4)$$

wobei  $k_A$  die Photonenabsorptionsrate,  $I_0$  die Intensität der zur Anregung verwendeten Lichtquelle und  $[F]$  die Konzentration der Fluorophore bezeichnet. [82]

Eng verwandt ist die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ , die durch

$$\tau_F = \frac{1}{k_s + k_{ns}} \quad (3.5)$$

berechnet werden kann und die mittlere Zeit bezeichnet, die ein Molekül im angeregten Singulettzustand  $S_1$  verbringt, ehe es durch spontane Emission eines Photons in den Grundzustand  $S_0$  relaxiert. Werden Fluorophore durch einen Lichtpuls angeregt, nimmt die Zahl der sich im angeregten Zustand befindenden Fluorophore  $[F^*(t)]$  mit der Zeit gemäß

$$\frac{d[F^*(t)]}{dt} = -(k_s + k_{ns}) [F^*(t)] \quad (3.6)$$

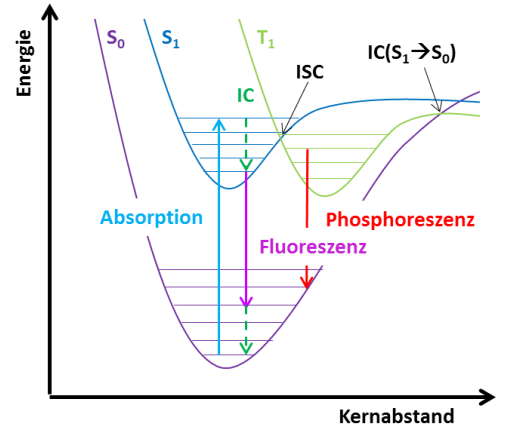


Abbildung 3.1.: Jablonski-Diagramm der Übergänge zwischen den Energieniveaus eines Fluorophors

ab. Die Fluoreszenzintensität  $I(t)$ , die zum Zeitpunkt  $t = 0$  nach der Anregung die Intensität  $I_0$  hat, nimmt demnach mit

$$I(t) = I_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau_F}\right) \quad (3.7)$$

ab. In diesem Sinne kann die Fluoreszenzlebensdauer als die Zeit verstanden werden, nach der die Intensität der Fluoreszenz auf das  $1/e$ -fache ihres ursprünglichen Wertes abgefallen ist. Sie ist eine weitere charakteristische Größe eines Fluorophors. [82]

### 3.2.2. Konfokale Mikroskopie

Für die Fluoreszenzspektroskopie werden heutzutage für Messungen in Lösungen konfokale Mikroskope eingesetzt. Die konfokale Mikroskopie verwendet dasselbe Objektiv zur Anregung und Detektion: Das einfallende Licht - heutzutage üblicherweise in Form eines Laserstrahls - wird mittels des Objektivs innerhalb des Probenvolumens fokussiert. Dieses Fokusvolumen entspricht dem Anregungsvolumen. Die Nutzung desselben Objektivs zum Einsammeln des emittierten Lichts, schränkt den Querschnitt des Detektionsvolumen in der  $xy$ -Fokusebene ein. Zusätzlich wird eine Lochblende vor dem Detektor benötigt, die das Detektionsvolumen zusätzlich in  $z$ -Richtung begrenzt (vgl. Abb. 3.2). Statt einer zusätzlichen Lochblende kann auch der die beschränkte Fläche des Detektors selbst diese Funktion übernehmen.

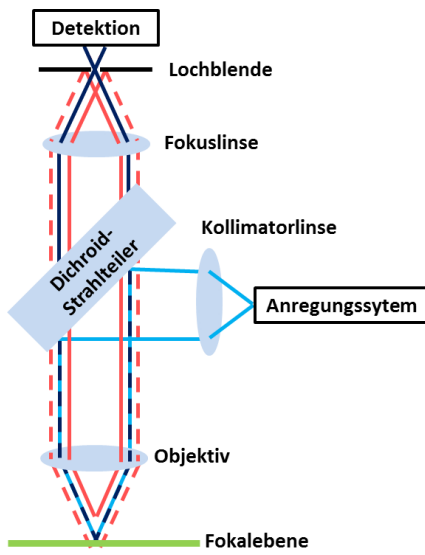


Abbildung 3.2.: **Darstellung des konfokalen Prinzips** Das Anregungslicht wird als paralleles Bündel über einen Dichroit-Strahlteiler auf das Objektiv reflektiert, das es in die Fokalebene fokussiert. Dasselbe Objektiv sammelt das Fluoreszenzlicht der Probe, das auf den Durchgang einer Lochblende fokussiert und anschließend detektiert wird. Rot eingezeichnet sind zusätzliche Strahlengänge von fluoreszierenden Punkten außerhalb der Fokalebene, um die axiale Begrenzung durch die Lochblende zu verdeutlichen.

auf das  $1/e^2$ -fache abgefallen ist. Das effektive Volumen wird in der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie verwendet, um die Konzentration der beobachteten Moleküle zu bestimmen (vgl. Abschnitt

Das resultierende Fokusvolumen für Anregung und Detektion wird als konfokales Volumen bezeichnet und hat typischerweise eine Größe im Bereich von  $10^{-16}$  L, ist also weniger als ein Femtoliter groß. Dadurch kann einerseits immer nur ein sehr kleiner Probenausschnitt betrachtet werden, andererseits werden aber Hintergrundsignale außerhalb des Fokus reduziert, sodass sich das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert.

Um die Größe des konfokalen Volumens zu berechnen, wird in der Regel angenommen, dass sich das effektive Beobachtungsvolumen näherungsweise mittels einer 3D-Gaussfunktion beschreiben lässt. Diese Annahme resultiert aus der Beschreibung der Intensitätsverteilung eines Laserstrahls in der Grundschwingungsmode als gaußförmig, sodass auch die Intensitätsverteilung  $I(x, y, z)$  des resultierenden Beobachtungsvolumens gaußförmig ist [84]:

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) \quad (3.8)$$

Aus diesen Überlegungen resultiert ein effektives Volumen  $V_{eff}$ , das mittels

$$V_{eff} = \frac{(\int I(x, y, z) dV)^2}{\int (I(x, y, z))^2 dV} = \pi^{3/2} w_0^2 z_0 \quad (3.9)$$

berechnet werden kann, wobei  $w_0$  den lateralen  $1/e^2$ -Radius des konfokalen Volumens darstellt und  $z_0$  den axialen. Der  $1/e^2$ -Radius ist dabei derjenige, nach dem ausgehend vom Mittelpunkt mit maximaler Laserintensität die Intensität

3.2.5). Das konfokale Volumen  $V_{conf}$  steht mit dem effektiven Volumen über

$$V_{conf} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} w_0^2 z_0 = \left(\frac{1}{2}\right)^{3/2} V_{eff} \quad (3.10)$$

in Beziehung, ist also um einen Faktor  $2^{3/2}$  kleiner als das effektive Volumen.

### 3.2.3. Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmikroskops

Der Einfluss verschiedener Fluorophore auf die Oligomerverteilung des A $\beta$ 40-Peptids während der Aggregation (vgl. Kap. 4) wurde mit dem in Abb. 3.3 dargestellten Aufbau untersucht: Ein mit einer Frequenz von 80 MHz gepulster Laser liefert das Anregungslicht für die Fluoreszenzmessungen. Dabei wurde für die Messungen an blauen Farbstoffen und entsprechend markierten Peptiden ein nach Wellenlängen durchstimmbarer Faserlaser mit einer Pulsweite von 1 ps (Femto Fiber pro TVIS, Toptica, Gräfelfing, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 490 nm eingesetzt, für Messungen mit roten Fluorophoren ein Diodenlaser (LDH Serie, PicoQuant, Berlin, Deutschland) mit 640 nm Wellenlänge und 90 ps Pulsweite. Ein Clean-Up-Filter (Z488/10 bzw. Z635/10) unterdrückt zusätzliche Banden im wellenlängenabhängigen Anregungsprofil des Lasers. Eine  $\lambda/4$ - und eine darauffolgende  $\lambda/2$ -Platte ermöglichen die Regulierung der Polarisation, um für Anisotropiemessungen linear polarisiertes Anregungslicht einzustellen. Ein darauf folgender verstellbarer Strahlabschwächer schwächt die Laserleistung auf das gewünschte Maß ab. Das Anregungslicht wird sodann in eine

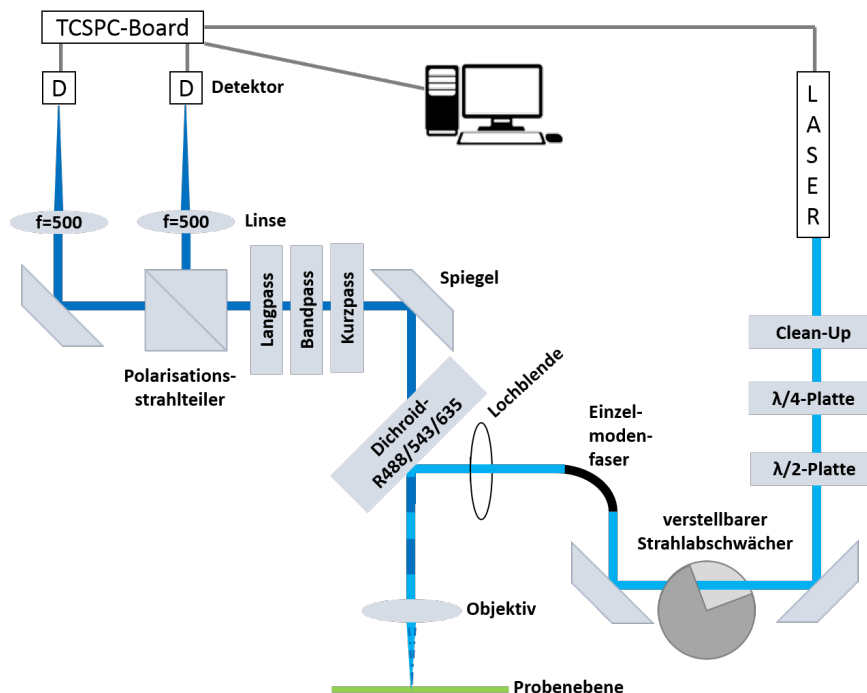


Abbildung 3.3.: Schematische nicht-maßstäbliche Darstellung des verwendeten Aufbaus für Fluoreszenzspektroskopie-Messungen. Das Anregungssystem vor dem konfokalen Mikroskop realisiert, wenn benötigt, linear polarisiertes Anregungslicht. Der vor die beiden Detektoren geschaltete Polarisationsstrahlteiler, der die Emission in zwei Komponenten parallel bzw. senkrecht zur Anregungspolarisation teilt, ermöglicht Messungen der Rotationsanisotropie. Das auf die Detektoren folgende TCSPC-Board registriert neben der Ankunftszeit eines Photons auch die näherungsweise der Fluoreszenzlebensdauer entsprechende relative Zeit zwischen Laserpuls und Photondetektion.

Large-Mode-Area-Einzelmodenfaser (SuperK FD7, NKT Photonics, Köln, Deutschland) gekoppelt, die es auf die Grundschwingungsmode reduziert und so ein homogeneres Strahlungsprofil herbeiführt. Außerdem wird der Strahl auf einen  $1/e^2$ -Radius von etwa 4 mm aufgeweitet. Eine Lochblende

passt anschließend die Strahlbreite an und ein Dichroid-Strahlteiler (R488/543/635) reflektiert den Strahl dann auf das Objektiv (60X/1.20 W PlanApo Objektiv, Zeiss, Jena, Deutschland), das ihn auf die Probe fokussiert. Dabei dient Wasser als Immersionsmedium, um die numerische Apertur ( $NA = n \sin \theta / 2$  mit  $\theta$  als Öffnungswinkel und  $n$  als Brechungsindex des Immersionsmediums) zu vergrößern und damit die Auflösung zu verbessern. Zudem wird so der Brechungsindex zwischen Probe und Immersionsmedium angeglichen und den Kontrast senkende Reflexion vermindert. Das gleiche Objektiv sammelt das von der fluoreszierenden Probe emittierte Licht ein, das den Dichroid-Strahlteiler diesmal passiert und auf einen Polarisationsstrahlteiler (Melles Griot, Rochester, USA) reflektiert wird. Dabei quert es eine Serie aus Kurzpass-, Bandpass- und Langpassfilter (496LP, Z525/50, 775SP für Fluorophore mit Emission im Bereich blauen Lichts bzw. 635LP, 775SP für Fluorophore mit Emission im Bereich roten Lichts), um Photonen, bei denen es unwahrscheinlich ist, dass sie aus dem Emissionsspektrum des Fluorophors stammen, herauszufiltern und so den Hintergrund zu reduzieren und Ramanlicht zu unterdrücken.

Der Polarisationsstrahlteiler teilt das Emissionslicht in eine Komponente parallel und eine senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts. Beide Komponenten werden über eine Fokuslinse mit 500 mm-Brennweite auf Einzelphoton-Avalanche-Dioden (SPCM-AQR-14, Excelitas, Vaudreuil-Dorion, Kanada) fokussiert, welche mittels photoelektrischem Effekt und daraus entstehender Ladungsträgerlawine einzelne Photonen detektieren können und deren geringe Detektionsfläche zugleich als die für die Konfokalmikroskopie benötigte Lochblende zur Begrenzung der axialen Ausdehnung des Fokusvolumens fungiert. Eine daran anschließende und mit dem gepulsten Laser synchronisierte TCSPC-Zählkarte (TimeHarp 260, PicoQuant, Berlin, Deutschland) mit 25 ps-Zeitauflösung erfasst abschließend per zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (s. gesonderter Abschnitt unten) die Ankunfts- und Relativzeiten der Photonen, d.h. die Rohmessdaten der Fluoreszenzspektroskopiemessungen.

Für spätere Messungen (dargestellt in Kap. 5) wurde dieser Aufbau um eine zusätzliche Lochblende ergänzt und das Objektiv gegen ein 60X/1.20 USPLASOP-W Super-Achromat Objektiv (Olympus, Shinjuku, Japan) ausgetauscht, das eine deutlich erhöhte molekulare Helligkeit ermöglicht. Zudem wurde die TimeHarp260-Zählkarte durch die MultiHarp 150 des gleichen Herstellers ersetzt, um mehr als zwei Detektoren gleichzeitig nebeneinander schalten zu können, was für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen aber ohne Relevanz ist, da für sie stets nur zwei Detektoren benötigt wurden.

### Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC)

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (kurz TCSPC von engl. *time-correlated single-photon-counting*) zeichnet für jedes registrierte Photon zwei Zeiten auf: Zum einen die makroskopische Ankunftszeit  $t$ , also die Zeit, die zwischen dem Start des Experiments und der Detektion des Photons vergangen ist, und zum anderen die Relativzeit  $t_{rel}$ , welche die Zeit zwischen anregendem Laserpuls und Detektion des Photons angibt. Letztere entspricht demnach der Zeit zwischen Anregung eines Fluorophors und seiner Relaxation in den Grundzustand unter Aussendung eines Photons und damit seiner Fluoreszenzlebensdauer. Abb. 3.4 veranschaulicht das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung.

Um Experimente mit TCSPC durchführen zu können, wird eine Zählkarte benötigt, mit der die Ankunftszeiten der Photonen nach Anregung durch einen Laserpuls aufgezeichnet werden. Dazu sendet der Laser bei jedem Puls ein Synchronisationssignal an die Zählkarte. Ebenso leitet der Detektor jedes Mal, wenn er ein Photon registriert hat, ein elektrisches Signal weiter. Dieses Signal wird im in dieser Arbeit verwendeten Aufbau zur Signalverbesserung durch ein *Inverter and Attenuator Module* (SIA400, Picoquant, Berlin, Deutschland) invertiert und abgeschwächt. Die von Laser und Detektor ausgesandten Signale gleichen sich zwar in Anstiegszeit und Signalform, nicht aber in der Amplitude. Ein Proportionaldiskriminator (CFD von engl. *Constant Fraction Discriminator*) wertet diese Signale aus, indem er zu den Zeitpunkt bestimmt, zu dem ein bestimmter

Anteil des Signalmaximums erreicht wurde.[85]  
 Moderne Zählkarten, wie die in dieser Arbeit verwendeten TimeHarp260 und MultiHarp150 von Picoquant, arbeiten mit einer so genannten TTTR-Datenakquise (von engl. *time-tagged time-resolved*). Statt nach dem Prinzip einer Stoppuhr bei jedem Laserpuls eine neue Zeitmessung auszulösen, die von der Detektion eines Photons gestoppt wird, wird für jeden Laserpuls und für jedes detektierte Photons die Zeit seit Beginn der Messung aufgezeichnet. Dazu folgt auf jeden Detektorpuls und den Synchronisationspuls des Lasers nach dem CFD zusätzlich ein Zeit-Digital-Wandler (TDC von engl. *Time-to-Digital-Converter*). Dieser ordnet jedem CFD-Signal eine Zeit zu, die in den entsprechenden Kanal (z.B. Kanal des Detektors oder Synchronisationskanal) gespeichert wird. Die Zeit zwischen Anregung eines Moleküls durch einen Laserpuls und der Detektion eines Photons kann anschließend arithmetisch als Differenz der entsprechenden Zeitdaten berechnet werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Totzeiten des TCSPC-Systems verringert sind und dass relativ problemlos mehrere Detektoren nebeneinander geschaltet werden können. [85]

Es eröffnet die Möglichkeit, neben der Messung von Fluoreszenzlebensdauern verschiedene Fluoreszenzspektroskopiemethoden mit Einzelphotonenzählung durchzuführen, für die zwei oder mehr Detektoren zugleich benötigt werden wie z.B. TCCD, Kreuzkorrelationsspektroskopie oder die gleichzeitige Messung der Intensitäten  $I_p$  und  $I_s$  bei der Bestimmung von Rotationsanisotropien.

### 3.2.4. Fluoreszenz-Anisotropie

Werden Fluorophore durch linear polarisiertes Licht angeregt, gelangen vor allem diejenigen Moleküle in den ersten angeregten Zustand, deren Übergangsdipolmoment für den Wechsel vom Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  parallel zu dem elektrischen Vektor des anregenden Lichts ausgerichtet ist. Durch die Wahl linear polarisierten Laserlichts ist es daher möglich, gezielt nur diejenigen Fluorophore innerhalb einer Probe mit isotrop verteilten Übergangsdipolmomenten von  $S_0$  nach  $S_1$  zur Anregung auszuwählen, deren Absorptionsdipolmoment eine bestimmte Richtung aufweist. Ebenso gilt auch für die Emission von Photonen durch einen Fluorophor, dass deren elektrischer Vektor parallel zum Übergangsdipolmoment des Fluorophors für den Wechsel von  $S_1$  nach  $S_0$  ausgerichtet ist. Das emittierte Licht wird in der Regel also ebenfalls polarisiert sein, wenn auch nicht zwangsläufig parallel zur Absorption, da Absorptions- und Emissionsdipolmoment feste Orientierungen innerhalb des Fluorophormoleküls besitzen, die nicht zwangsläufig übereinstimmen müssen. Wie stark das emittierte Licht nach Anregung durch linear polarisiertes Licht in Richtung des anregenden Lichts polarisiert ist, wird mittels der Anisotropie quantifiziert. [16, 82]

Dabei muss zwischen der fundamentalen Anisotropie  $r_f$ , die eine intrinsische Eigenschaft der Fluorophore darstellt, und der experimentell beobachtbaren Anisotropie  $r$  unterschieden werden. Die fundamentale Anisotropie

$$r_f = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (3.11)$$

hängt einzig vom Winkel  $\beta$  zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment ab. Sie bezeichnet die Fluoreszenzanisotropie, die ein Molekül aufweisen würde, gäbe es keine zusätzlichen depolarisierenden Effekte. [16] Die experimentell beobachtbare Anisotropie hingegen wird nicht nur vom Fluorophor selbst, sondern auch durch depolarisierende Effekte bestimmt, da z.B. der in den näch-

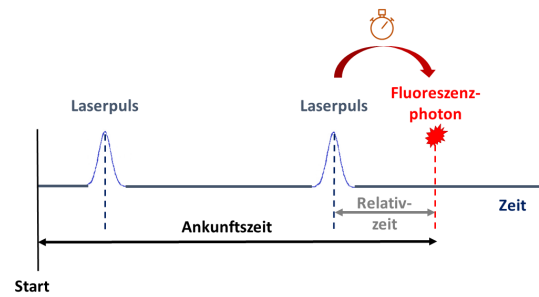


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung Neben den Ankunftszeiten der detektierten Photonen werden auch die Zeiten der Laserpulse über einen Synchronisationskanal registriert. Aus der Differenz zwischen der Ankunftszeit eines detektierten Photons und der Registrierung des letzten Laserpulses davor wird eine Relativzeit berechnet.

sten Absätzen beschriebene Verlust der Anisotropie durch Rotationsdiffusion von der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur abhängig ist. Zur Messung der Anisotropie wird das emittierte Licht mittels zweier Analytoren in eine hinsichtlich des Anregungslichts parallele Komponente  $I_p$  und eine entsprechend senkrechte Komponente  $I_s$  aufgesplittet. Die Anisotropie ist dann definiert als

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 2I_s} \quad (3.12)$$

Diese Definition gilt unabhängig von möglichen depolarisierenden Effekten. [16]

Den wichtigsten depolarisierenden Effekt stellt die Rotationsbewegung des Fluorophormoleküls in der Lösung dar, weshalb Anisotropiemessungen auch zur Beobachtung von Rotationsbewegungen eingesetzt werden. Aufgrund der Rotationsdiffusion hängt die in einer Ensemble-Messung beobachtete Orientierung der Fluorophore während der Photonemission zunehmend weniger von ihrer Ausrichtung während der Anregung ab. Sowohl parallel als auch senkrecht zum Anregungslicht gemessene Fluoreszenzintensität fallen aufgrund der begrenzten Fluoreszenzlebensdauer mit der Zeit exponentiell ab (vgl. Abb. 3.5). Daraus resultiert eine zeit-abhängige Anisotropie

$$r(t) = r_0 \exp^{-t/\tau_R} \quad (3.13)$$

wobei  $r_0$  die Anisotropie zum Zeitpunkt  $t = 0$  darstellt und  $\tau_R$  charakterisiert die Rotationsdiffusion. [16]

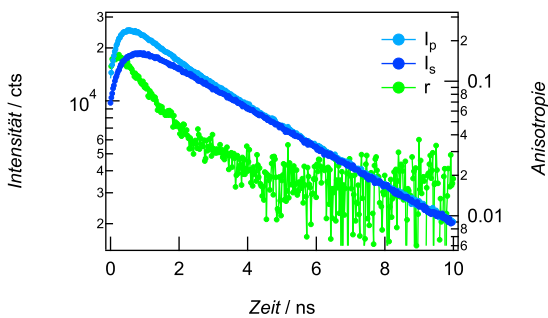


Abbildung 3.5.: **Beispiel einer Anisotropiemessung an Atto488-A $\beta$ 40** Deutlich erkennbar ist der exponentielle Abfall von paralleler Komponente  $I_p$  und senkrechter Komponente  $I_s$ , der in eine zeitabhängige Anisotropie mündet.

In diesem Fall kann eine Depolarisation sowohl durch die Rotationsdiffusion des kovalent gebundenen Fluorophors um die eigene Achse stattfinden als auch durch die Rotationsbewegung des gesamten, aus Peptid bzw. Protein und Fluorophor zusammengesetzten Moleküls. Damit wird der in Gleichung 3.13 beschriebene Abfall der Anisotropie zu einem 2-Komponenten-Abfall [72]:

$$f(t) = y_0 + (A_f \exp^{-t/\tau_R^f} + A_{f+p}) \exp^{-t/\tau_R^{f+p}} \quad (3.14)$$

$A_f$  und  $A_{f+p}$  sind dabei die Amplituden des Anisotropieabfalls des Fluorophors allein bzw. im Komplex dem Peptid oder Protein, und  $\tau_R^f$  und  $\tau_R^{f+p}$  stellen die entsprechenden charakteristischen Zeitkonstanten dar. Letztere kann genutzt werden, um die Rotationsdiffusionskonstante  $D_r$  zu berechnen als

$$D_r = \frac{1}{6\tau_R} \quad (3.15)$$

Da zugleich auch

$$D_r = \frac{k_b T}{8\pi\eta R_h^3} \quad (3.16)$$

Im Fall einer Rotationszeit, die deutlich geringer ist als die Fluoreszenzlebenszeit, d.h.  $\tau_R \ll \tau_F$ , drehen sich die Fluorophore bereits während der Zeitspanne, die sie sich im angeregten Zustand befinden, so sehr, dass das emittierte Licht vollständig unpolarisiert ist. Umgekehrt kann bei einer sehr langen Rotationszeit eine starke Polarisation des emittierten Lichts beobachtet werden. [82]

Ungebundene Fluorophore rotieren in der Regel sehr schnell in wässrigen Lösungen - die in dieser Arbeit eingesetzten Farbstoffe besitzen Rotationszeiten in der Größenordnung von  $10^{-10}$  s, während die Fluoreszenzlebensdauer im Bereich weniger Nanosekunden liegt. Die Bindung des Farbstoffs an ein Peptid oder Protein verändert dieses Rotationsverhalten:



gilt, kann aus der Rotationszeit über die Einstein-Smolochowski-Gleichung auch der hydrodynamische Radius des Fluorophor-Peptid-Komplexes aus berechnet werden:

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3\tau_R kT}{4\pi\eta}} \quad (3.17)$$

Dabei steht  $k$  für die Boltzmann-Konstante,  $T$  für die Temperatur und  $\eta$  beschreibt die Viskosität des Lösungsmittels. Über das Verhältnis der Amplituden der Anisotropieabfälle lässt sich ein Ordnungsparameter

$$S^2 = \frac{A_{f+p}}{A_f + A_{f+p}} \quad (3.18)$$

zweiter Ordnung berechnen, aus dem sich die Rate der relativen Reorientierung  $D_{\perp}$  des Fluorophors hinsichtlich des Peptids oder Proteins bestimmen lässt als:

$$D_{\perp} = \frac{(1 - S^2)}{6\tau_R^f} \quad (3.19)$$

Sie gibt an, wie schnell die Rotationsbewegung des Fluorophors wäre, wäre jegliche Peptidbewegung eliminiert. Je größer  $D_{\perp}$ , desto schneller kann eine Reorientierung des Fluorophors stattfinden und desto geringer ist die Wechselwirkung zwischen Peptid und Fluorophor. Damit ist die Rate der relativen Reorientierung ein Maß dafür, wie frei beweglich ein Farbstoff trotz Bindung an ein Peptid ist. [72]

### 3.2.5. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Diffundieren Fluorophore aufgrund Brownscher Molekularbewegung durch das Beobachtungsvolumen eines konfokalen Mikroskops, führt dies zu Intensitätsfluktuationen: Befindet sich ein fluoreszierendes Molekül innerhalb des Fokusvolumens, löst es einen sogenannten Burst an Photonen aus, d.h. eine temporär stark gesteigerte Photonendichte, die sich bei Darstellung der gemessenen Intensität als deutlich erhöhtes Intensitätssignal äußert. Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (kurz FCS von engl. *fluorescence correlation spectroscopy*) analysiert solche Intensitätsfluktuationen durch zeitliche Korrelation (vgl. Abb. 3.6). Aus dem Abfall der sich ergebenden Korrelationskurven  $G(\tau)$  können Rückschlüsse beispielsweise über die Besetzung von Triplettzuständen [86], das Rotationsverhalten [87] oder die Translationsdiffusion [84, 87] von Molekülen gezogen werden. Die letztgenannte Beobachtung des Diffusionsverhaltens und daraus folgender Parameter stellt vermutlich den häufigsten Einsatz der FCS dar; dafür wird sie auch in dieser Arbeit eingesetzt.

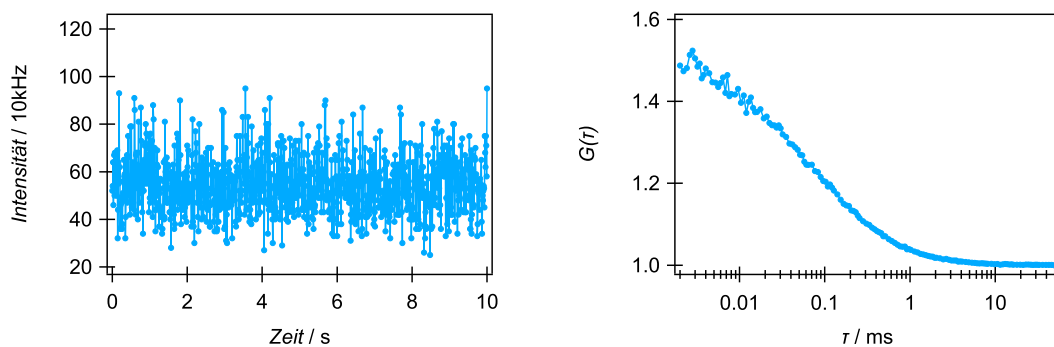


Abbildung 3.6.: **Beispiel einer FCS-Messung an dem Fluorophor Atto488** Links zu sehen ist die aufgenommene Intensitätsfluktuation im konfokalen Volumen, die bei Korrelation in die rechts dargestellten FCS-Kurve mündet.

Mathematisch ergibt sich die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität  $F(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  mit derjenigen  $F(t + \tau)$  zum dazu um  $\tau$  späteren Zeitpunkt  $(t + \tau)$  über

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.20)$$

wobei  $\langle F \rangle$  die über die gesamte Messung gemittelte durchschnittliche Fluoreszenzintensität darstellt. Dabei gilt

$$\langle F(t) F(t + \tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) F(t + \tau) dt \quad (3.21)$$

d.h. es wird über die Aufnahmezeit der Messung  $T$  normalisiert. Statt mit der in Gleichung 3.20 beschriebenen Autokorrelation der Fluoreszenzintensität wird allerdings in der Regel mit derjenigen der Fluoreszenzintensitätsfluktuation  $\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t)$  gearbeitet, die durch

$$G(\tau) = 1 + \frac{\delta F(0) \delta F(\tau)}{\langle F \rangle^2} \quad (3.22)$$

gegeben ist. [16]

Bei einer solchen Autokorrelationsfunktion kann auf der ns- bis  $\mu$ s-Skala unter Umständen die Rotationsdiffusion untersucht werden, im  $\mu$ s-Bereich ggf. die Triplettdynamik, wenn der Tripletzustand durch eine hohe Leistung des anregenden Lasers mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit besetzt wird. Translationsdiffusion äußert sich je nach Größe des diffundierenden Molekül in einem Abfall meist auf einer Zeitskala von Millisekunden bis Sekunden. [88] Die in dieser Arbeit für Fluorophore und A $\beta$ -Komplexe beobachteten Diffusionszeiten liegen allerdings im Bereich von  $10^{-5}$  s bis  $10^{-3}$  s.

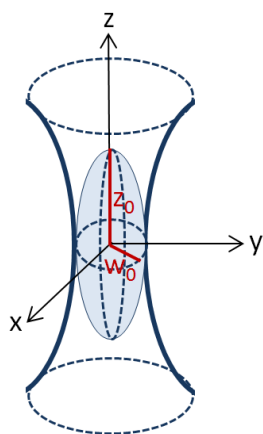


Abbildung 3.7.: **Darstellung des Beobachtungsvolumen mit eingezeichneten lateralen und axialen Radien**

Können Tripletteffekte vernachlässigt werden und wird das effektive konfokale Volumen als gaußförmig angenommen (vgl. Glg. 3.8 und 3.9), kann die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  mit den in Abbildung 3.7 eingezeichneten Bezeichnungen für die Maße des Beobachtungsvolumens für den Fall dreidimensionaler Translationsdiffusion durch

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \quad (3.23)$$

beschrieben werden, wobei  $D$  den Diffusionskoeffizienten des betrachteten Moleküls darstellt [87]. Nimmt man zusätzlich an, dass  $z_0$  deutlich größer ist als  $w_0$ , sodass die Diffusionszeit eines Moleküls  $\tau_D$  mit bekannter Diffusionskonstante  $D$  durch das konfokale Volumen in guter Näherung nur vom lateralen Querschnitt  $w_0^2$  abhängt, kann der laterale Radius des konfokalen Volumens experimentell über

$$w_0^2 = 4D\tau_D \quad (3.24)$$

bestimmt werden. Unter Verwendung dieser Gleichung sowie von  $S = w_0/z_0$  und  $G(0) = 1/N$  wird Glg. 3.23 zu

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \quad (3.25)$$

Die Diffusionszeit  $\tau_D$  durch das Beobachtungsvolumen kann demnach bestimmt werden als die Zeit, nach der die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  auf die Hälfte des Wertes  $G(0)$  abgefallen ist. [16]

Über die Diffusionszeit kann mittels einer Referenzprobe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten die Größe des konfokalen Volumens bestimmt werden, sodass sich aus Gleichung 3.24 der Diffusionskoeffizient des untersuchten Moleküls ergibt. Aus diesem folgt dann auch hydrodynamische Radius des Moleküls über

$$R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D} \quad (3.26)$$

Mit dem inversen y-Achsenabschnitt  $N$  lässt sich die Konzentration der beobachteten fluoreszierenden Moleküle bestimmen, da er die durchschnittliche Teilchenzahl im Detektionsvolumen angibt. Im Fall einer nicht vernachlässigbaren Hintergrundfluoreszenz  $F_{bg}$  kann die beobachtete Korrelationsamplitude jedoch reduziert sein. Dann ist eine Korrektur der Form

$$N_{corr} = N \left( 1 + \frac{\langle F_{bg} \rangle}{\langle F \rangle - \langle F_{bg} \rangle} \right)^2 \quad (3.27)$$

notwendig. Die Konzentration der beobachteten Moleküle ergibt sich dann über

$$c_{FCS} = \frac{N_{corr}}{N_A V_{eff}} \quad (3.28)$$

wobei  $N_A$  die Avogadrokonstante bezeichnet.

Die in Gleichung 3.25 angegebene Korrelationsfunktion beschreibt die im FCS-Experiment erhaltene Funktion nur dann korrekt, wenn die Näherung des Fokusvolumens als dreidimensionales Gaußprofil (vgl. Kap. 3.2.2) zutreffend ist. Tatsächlich wird die Geometrie jedoch meist davon abweichen - aufgrund Ungenauigkeiten der Justage, dem Einfluss optischer Elemente des Aufbaus wie z.B. polarisations- und wellenlängenabhängigen Transmissionsunterschieden einzelner Komponenten oder Fluoreszenzeigenschaften des untersuchten Systems wie z.B. Sättigungseffekte oder Rayleigh- bzw. Ramanstreuung des Mediums [89, 90]. Dieser Abweichung kann durch einen zusätzlichen Parameter  $\beta$  Rechnung getragen werden [90]; Gleichung 3.25 wird dann zu

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \left( \frac{\tau}{\tau_D} \right)^\beta \right)^{-1} \left( 1 + S^2 \left( \frac{\tau}{\tau_D} \right)^\beta \right)^{-1/2} \quad (3.29)$$

Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmikroskopie-Aufbau teilt die vom Objektiv gesammelte Fluoreszenz durch einen polarisationsabhängigen Strahlteiler auf zwei Detektoren auf (vgl. 3.2.3). In den Detektoren kann es zum sogenannten *Afterpulsing* kommen, d.h. dass ein von der untersuchten Probe emittiertes Photon in mehr als ein elektronisches Signal resultiert. Deshalb wurde statt der Autokorrelationsfunktion in dieser Arbeit meistens die Kreuzkorrelationsfunktion  $G_{12}(\tau)$  verwendet, die mittels

$$G_{12}(\tau) = \frac{\langle F_1(t) F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1 \rangle \langle F_2 \rangle} \quad (3.30)$$

gebildet wird [91].

### 3.3. Entwicklung einer Burstanalyse für smFS-Messungen

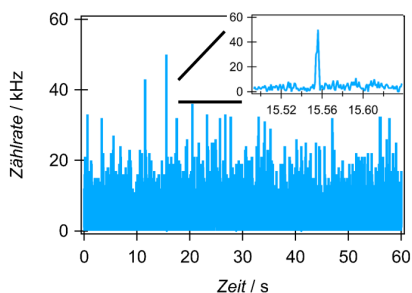


Abbildung 3.8.: Bursts in einer smFS-Messung

Die Diffusion eines selbst-fluoreszenten oder mit einem Farbstoff markierten Moleküls durch ein konfokales Volumen führt in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie (smFS von engl. *single-molecule Fluorescence Spectroscopy*) zu einer lokal deutlich erhöhten zeitlichen Photonendichte, sichtbar als sogenannter Burst (s. Abb. 3.8). Aus der Analyse dieser Bursts lassen sich - je nach gewählter Markierung der Moleküle und verwendetem Aufbau - Informationen zu Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzlebensdauer, Diffusionszeiten, aber auch FRET-Effizienz oder Anisotropie und Rotationszeiten extrahieren und damit das zugrundeliegende Molekül charakterisieren [92]. In dieser Arbeit soll die

Burst-Analyse die Größenverteilungen von Oligomeren in aggregierenden A $\beta$ -Lösungen dokumentieren. Dafür wurde ein Programm in Igor Pro (www.wavemetrics.com, WaveMetrics Inc., Portland,

USA, Versionen 6 bis 8) geschrieben, das die beiden für eine Burstanalyse notwendigen Schritte enthält: Die Selektion der Bursts im Unterschied zum Hintergrund und ihre anschließende Analyse. Dieses Programm wird im Folgenden vorgestellt.

### 3.3.1. Experimentelle Voraussetzungen und Datensätze

Eine Burstanalyse kann nur dann aussagekräftig sein, wenn (fast) jeder Burst tatsächlich genau ein Peptid oder Aggregat repräsentiert - der Fall, dass mehrere markierte Peptide bzw. Aggregate sich gleichzeitig im konfokalen Volumen befinden, muss so selten sein, dass er für die Analyse vernachlässigbar ist. Gleichzeitig sollten ausreichend viele Bursts entstehen, um mit einer annehmbaren Messzeit - in dieser Arbeit in der Regel eine Stunde - ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Eine Farbstoff-Konzentration in der Größenordnung von  $10^{-11}$  M bis  $10^{-10}$  M ermöglichte dies in Abhängigkeit vom Detektionsvolumen bei den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten. Für eine Aggregation des A $\beta$ -Peptids in Lösung werden allerdings Proteinkonzentrationen von einigen  $\mu$ M benötigt. Für die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen wurden die aggregierten Lösungen daher entweder für die Messung entsprechend verdünnt (s. Kap. 4) oder mit einem extrem geringen DOL gearbeitet (s. Kap. 5).

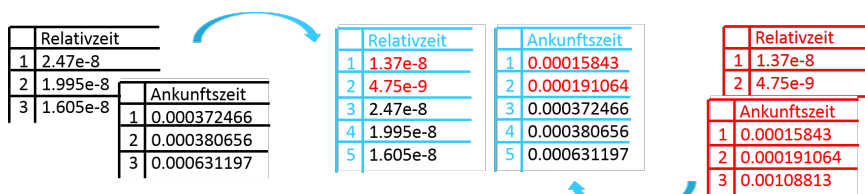


Abbildung 3.9.: **Rohdaten der Burstanalyse** Ausgangspunkt für die Burstanalyse sind die vom TCSPC-Board in beiden Detektionskanälen aufgezeichneten Ankunfts- und Relativzeiten, die in einem ersten Schritt zu einem gemeinsamen Datensatz zusammengeführt werden: In den schwarzen Tabellen sind Zeitdaten aus dem einem Detektionskanal aufgeführt, in den roten die aus dem anderen. Für die blaue Tabelle wurden beide Datensätze nach Ankunftszeiten sortiert zusammengefügt.

Die Messungen generieren als Datensätze Listen mit Ankunfts- und Relativzeiten der detektierten Photonen (s. auch Abschnitt 3.2.3 und Abb. 3.9). Da für die Selektion der Bursts die insgesamt beobachtete Photonendichte unabhängig von der möglichen Rotation des Moleküls relevant ist, wurden die aus ppol- und spol-Detektionskanal stammenden Daten zunächst nach Ankunftszeiten sortiert in einer einzigen Liste zusammengeführt (vgl. Abb. 3.9 und 3.10). Dabei wurden die Zeiten jeweils als ppol oder spol markiert, um sie später für die Berechnung der Anisotropie wieder den beiden unterschiedlichen Detektionskanälen zuordnen zu können. Dieser Schritt entfällt, wenn mit nur einem Detektionskanal gearbeitet wurde.

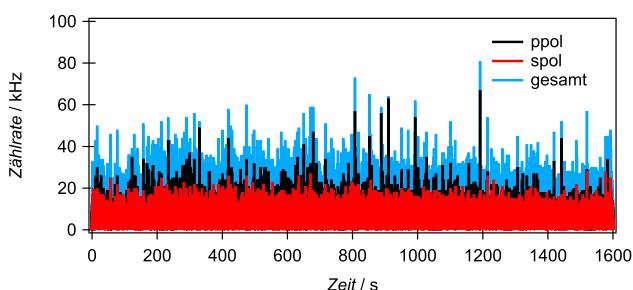


Abbildung 3.10.: **Zusammenführung der Daten aus ppol- und spol-Kanal** Um auf Grundlage der Photonendichte Bursts zu selektieren, werden die in ppol- und spol-Kanal aufgezeichneten Daten (schwarz bzw. rot) zunächst nach Ankunftszeiten geordnet zusammengeführt (blau).

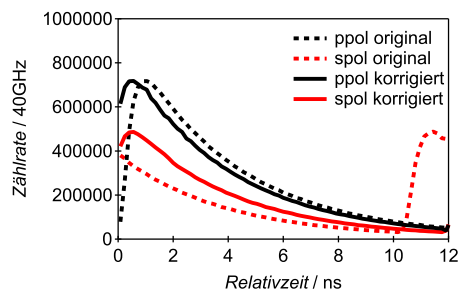


Abbildung 3.11.: **Korrektur der Relativzeiten** Um den Zeitpunkt des Laserpulses zum Nullpunkt der Relativzeiten zu machen, werden die Relativzeiten entsprechend um eine Zeit  $t_{offset}$  verschoben.

Aufgrund der internen Synchronisation und Verarbeitung entspricht der Zeitpunkt, zu dem ein Laserpuls auftritt, nicht zwangsläufig dem Nullpunkt der detektierten Relativzeiten. Daher werden die Relativzeiten entsprechend korrigiert (vgl. Abb. 3.11). Dazu werden zunächst Histogramme der Relativzeiten gebildet, anhand derer der Offset bestimmt wird. Als Bruchteil  $n$  des Maximums  $max$  wird dann ein Schwellenwert  $level$  definiert, der nach von niedrigen zu hohen Relativzeiten gehend gesucht wird. Die zu diesem Schwellenwert gehörende Zeit  $t_{offset}$  entspricht dann der Offset-Zeit, um die alle Relativzeiten des entsprechenden Detektionskanals verschoben werden müssen. Um durch dieses Verfahren keine negativen Relativzeiten zu erhalten, werden dazu zunächst alle Zeiten, die kleiner als  $t_{offset}$  sind, um die Synchronisationszeit  $synctime$ , d.h. die Zeit zwischen zwei Laserpulsen, verschoben, ehe anschließend  $t_{offset}$  abgezogen wird:

```

starting from  $t = 0$  find  $level$  in histogram
 $t_{offset} = x$ -value of  $level$ 
for (all photons  $i$ ) {
  if ( $i$  has a relative time  $t_{rel,i} < t_{offset}$ ) {
     $t_{rel,i} + = synctime$ 
  }
   $t_{rel,i} - = t_{offset}$ 
}

```

Diese Korrektur wird individuell für jeden Detektionskanal ausgeführt. Sie ermöglicht es, zu einem späteren Zeitpunkt der Analyse die Fluoreszenzlebensdauer korrekt zu bestimmen.

### 3.3.2. Selektion der Burst-Photonen

Eine Möglichkeit Bursts aus den Datensätzen herauszufiltern, besteht darin, eine Intensitätsschwelle zu definieren, oberhalb derer eine temporäre Intensitätsfluktuation als Burst gezählt wird (s. z.B. [93]). Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, dass die Rohdaten, die in Form der Ankunftszeiten von Photonen vorliegen, hierzu zunächst in Intensitätshistogramme umgewandelt werden müssen, bei denen die Genauigkeit, mit der sie die gemessenen Daten wiedergeben, aber auch die Deutlichkeit, mit der sie Differenzen innerhalb der Daten widerspiegeln, von der Wahl der Histogrammzellen abhängt. Es müssen also gleich zwei Parameter optimiert werden: die Breite der Histogrammzellen und die Höhe des Intensitätsschwellenwerts. Bei heterogenen Systemen - wenn also z.B. Aggregate unterschiedlicher Größe beobachtet werden - hinge die optimale Wahl dieser beiden Parameter jedoch von der Größe des beobachteten Objekts ab, was es erschweren würde, ein für den gesamten Datensatz passendes Parameterpaar zu finden.

Eine Alternative besteht darin, die Abstände zwischen den Ankunftszeiten der Photonen zu analysieren [94]. Ein äquivalenter Weg wurde für diese Arbeit gewählt, indem eine gleitende Photondichte, über die einzelne Photonen entweder als Bestandteil eines Bursts oder als Hintergrundphoton klassifiziert werden, eingeführt wurde. Im Programmcode dient hierfür der Parameter  $th$ , der den maximalen zeitlichen Abstand der zehn ein Photon  $i$  mit Ankunftszeit  $t_i$  umgebenden Photonen zueinander beschreibt:

```

if ( $t_{i+5} - t_{i-5} < th$ ) {
   $i$  is part of a burst
}

```

Typischerweise liegt  $th$  bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zwischen 0.1 ms und 0.5 ms. Der genaue Wert von  $th$  hängt dabei von der Konzentration der Farbstoffe ab: Je geringer die Konzentration, desto größer kann  $th$  gewählt werden, und dennoch sicher zwischen Bursts und Hintergrund unterschieden werden, während bei einer Konzentration der Farbstoffe nur knapp

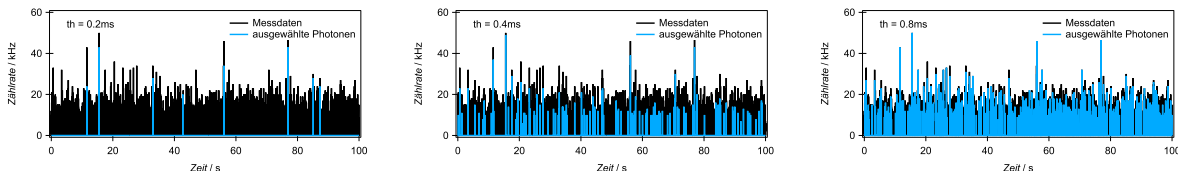


Abbildung 3.12.: **Auswirkung des gewählten Schwellenwerts auf die Selektion von Photonen** Werden bei einem zu kleinen Schwellenwert  $th$  nur die höchsten Bursts ausgewählt (links) und viele kleinere übersehen, wertet die Analyseroutine bei einem zu großen  $th$  auch große Teile des Hintergrunds als Bursts (rechts).

unterhalb der Grenze für Einzelmolekülmessungen mittels eines kleinen  $th$  eine recht scharfe Grenze gesetzt werden muss. Ebenso kann ein hoher Hintergrund durch das Lösungsmittel oder nicht markierte Proteine eine recht scharfe Selektion erforderlich machen. Die Auswirkung des Schwellenwerts  $th$  auf die Burstselektion wird in Abb. 3.12 demonstriert.

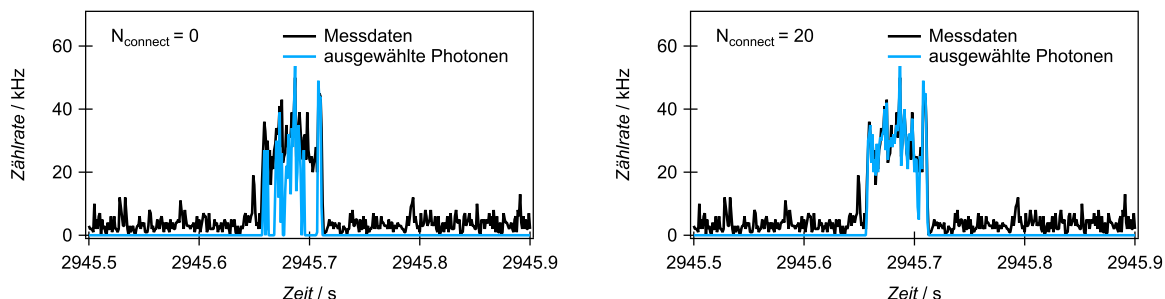
Muss aufgrund einer relativ hoch konzentrierten Probe ein sehr kleines  $th$  gewählt werden, kann es sein, dass aufgrund lokaler Photonendichtefluktuationen bei langsam durch das konfokale Volumen diffundierenden Objekten Bursts in mehrere Bursts zerteilt werden, da einzelne Photonen innerhalb des Bursts dem Hintergrund zugeordnet werden (vgl. Abb. 3.13a). Aus diesem Grund steht dem Schwellenwert  $th$  der Parameter  $N_{connect}$  entgegen; er gibt an, über wie viele Photonen hinweg zwei aufgrund des  $th$ -Kriteriums voneinander isolierte Bursts zu einem größeren Burst verbunden werden. Anders ausgedrückt: Alle  $x$  Photonen zwischen dem  $i$ -ten und dem  $(i + x)$ -ten Photon werden einem Burst zugerechnet, wenn  $x < N_{connect}$  ist:

```

if (i is part of a burst && (i + x) is part of a burst && x < N_connect){
    for (all photons i_j between i and (i + x){
        i_j is part of a burst
    }
}

```

Auf diese Weise können die Bursts dann trotz einer scharfen  $th$ -Schwelle vollständig erfasst werden (vgl. Abb. 3.13b). Die beiden Parameter  $th$  und  $N_{connect}$  bedingen einander und sollten deshalb immer im Wechselspiel miteinander betrachtet werden: Ein kleines  $th$  zieht häufig ein großes  $N_{connect}$  nach sich, während umgekehrt bei einem großen  $th$  ein niedriges  $N_{connect}$  gewählt oder es gar auf  $N_{connect}=0$  gesetzt werden kann. Die genauen Werte für die beiden Parameter müssen für jede Messreihe individuell bestimmt werden.



(a) unvollständige Erfassung eines Bursts

(b) vollständige Burst-Erfassung

Abbildung 3.13.: **Einfluss des Parameters  $N_{connect}$  auf die Erfassung eines Bursts** Da die Photonendichte auch innerhalb eines Bursts lokal variiert, können einzelne Photonen des Bursts als Hintergrundphotonen markiert werden, wodurch der Burst in mehrere kleinere Bursts zerteilt wird, die nicht den tatsächlich beobachteten Fall widerspiegeln (a). Durch den Parameter  $N_{connect} > 0$  werden diese Einzelbursts wieder zusammengeführt (b).

Die bisher beschriebenen Kriterien ordnen jedem Photon einzeln entweder die Zugehörigkeit zu einem Burst oder zum Hintergrund zu, ohne dass dabei der gesamte Burst betrachtet wird. Dadurch kann es passieren, dass auch sehr kleine Bereiche des Messdatensatzes mit lokal hoher Photondichte als Burst gezählt werden - im Extremfall besteht dabei ein Burst aus nur einem einzigen Photon. Um dies zu verhindern, wurde ein weiterer Parameter  $N_{min}$  eingeführt, der die Mindestanzahl  $N$  an Photonen festlegt, die ein Burst besitzen muss, um als solcher klassifiziert zu werden:

```

if (all photons between  $i_1$  und  $i_N$  define a burst &&  $N < N_{min}$ ) {
  for (all photons  $i_j$  from  $i_1$  to  $i_N$ ) {
     $i_j$  is not part of a burst
  }
}
    
```

Der Parameter  $N_{min}$  wird insbesondere dann relevant, wenn bestimmte Spezies innerhalb einer Population gezielt herausgefiltert werden sollen, etwa Bursts von Oligomeren und Fibrillen erfasst werden sollen, nicht aber Bursts, die von Monomeren verursacht wurden. Für die Selektion von Oligomeren wurde dafür die Anzahl der Photonen in einem Monomer  $N_{phot,mon}$  durch die mittlere molekulare Helligkeit  $\langle MB \rangle_{Bursts}$  aller Bursts und die mittlere Verweildauer  $\langle \tau_{dwell} \rangle_{Bursts}$  der durch die Bursts beschriebenen Monomere im konfokalen Volumen bestimmt

$$N_{phot,mon} = \langle MB \rangle_{Bursts} \times \langle \tau_{dwell} \rangle_{Bursts} \quad (3.31)$$

und  $N_{min}$  festgelegt als

$$N_{min} = 2N_{phot,mon} \quad (3.32)$$

### 3.3.3. Quantitative Burst-Analyse

Die wie in Abschnitt 3.3.2 dargelegt aus den Messdaten herausgefilterten Bursts lassen sich hinsichtlich verschiedener physikalischer Größen quantitativ charakterisieren.

Größe	Symbol	Berechnung
Mittlere Ankunftszeit	$t_{avg}^j$	$t_{avg}^j = \frac{1}{N} \sum_i t_i^j$
Fluoreszenzlebensdauer	$\tau_F$	$\tau_F = \frac{1}{N} \sum_i t_{rel,i}^j$
Quenching-korrigierte Photonenzahl	$N_{phot}$	$N_{phot} = N \frac{\tau_{F,mon}}{\tau_F^j}$ bzw. $N_{phot} = (N - N_{bg}) \frac{\tau_{F,mon}}{\tau_F^j}$
Verweildauer im konfokalen Volumen	$\tau_{dwell}$	$\tau_{dwell} = \frac{\sqrt{2}}{N-1} \sqrt{\sum_i (t_i^j - t_{avg}^j)^2}$
Molekulare Helligkeit	$MB$	$MB = \frac{N_{phot}}{\tau_{dwell}}$
Anisotropie	$r$	$r = \frac{ip-is}{ip+2is}$ mit $ip = \sum_i t_{rel,i}^{j,ppol}$ und $is = \sum_i t_{rel,i}^{j,spol}$

Tabelle 3.3.: Berechnung physikalischer Größen zur quantitativen Charakterisierung von Bursts

Jeder Burst  $j$  besteht dabei aus  $N$  Photonen ( $N$  individuell für jeden Burst), denen jeweils die Ankunftszeiten  $t_i^j$  und die Relativzeiten  $t_{rel,i}^j$  zugeordnet sind. Daraus können die mittlere Ankunftszeit der Photonen  $t_{avg}^j$ , die um Quenching-Effekte korrigierte Photonenzahl  $N_{phot}$ , die Verweildauer des

Peptids oder Aggregats im konfokalen Volumen  $\tau_{dwell}$ , die molekulare Helligkeit  $MB$  und die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$  berechnet werden wie in Tabelle 3.3 dargestellt.

Für die Kalkulation der Quenching-korrigierten Photonenzahl  $N_{phot}$  wurde ein Korrekturterm  $\tau_{F,mon}/\tau_F^j$  eingeführt, der durch das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{F,mon}$  von Monomeren und der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F^j$  des jeweiligen Bursts  $j$  bestimmt wird. Dadurch wird die Verringerung der pro Zeiteinheit emittierten Photonen aufgrund einer veränderten Fluoreszenzlebensdauer ausgeglichen. Überdies können die durch den Hintergrund des Puffers bzw. Lösungsmittels erzeugten Photonen abgezogen werden, indem eine separate Hintergrundmessung genau analog ausgewertet und abgezogen wird, mathematisch ausgedrückt durch die Zahl  $N_{bg}$ .

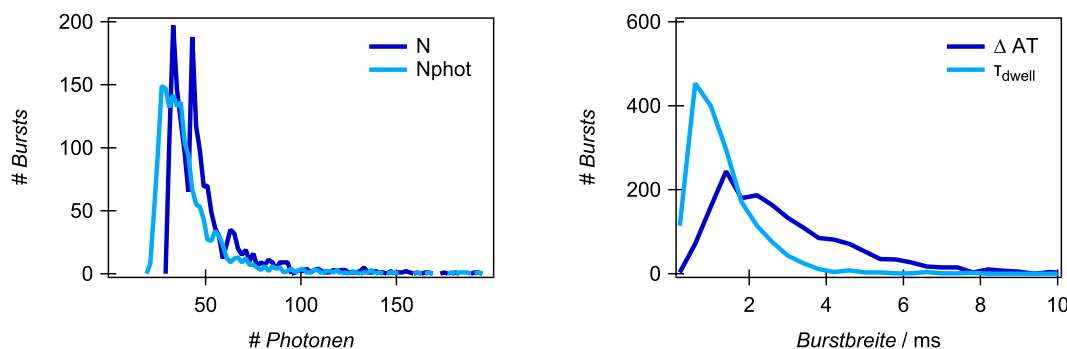


Abbildung 3.14.: **Beispielhafte Burstanalyse:  $N_{phot}$  und  $\tau_{dwell}$**  Ein Maß für die Größe eines Bursts und damit auch die potentielle Größe des detektierten Peptids oder Aggregats ist die Quenching-korrigierte Photonenzahl  $N_{phot}$ , die sich aus der Anzahl der Photonen der Bursts  $N$  ergibt. Die Verteilungen, die sich für beide aus einem Beispieldatensatz einer 4 h nach *pH9-Protokoll* aggregierten Atto488-A $\beta$ 40-Lösung mit DOL 5 % ergeben, sind links dargestellt. Die Abbildung rechts zeigt die Verteilungen der Differenz zwischen erstem und letztem Burstphoton  $\Delta AT$  und der Verweildauer  $\tau_{dwell}$  entsprechend der Halbwertsbreite der Bursts für den gleichen Datensatz. Analyseparameter:  $th=0.4$  ms,  $N_{min}=30$ ,  $N_{connect}=20$ .

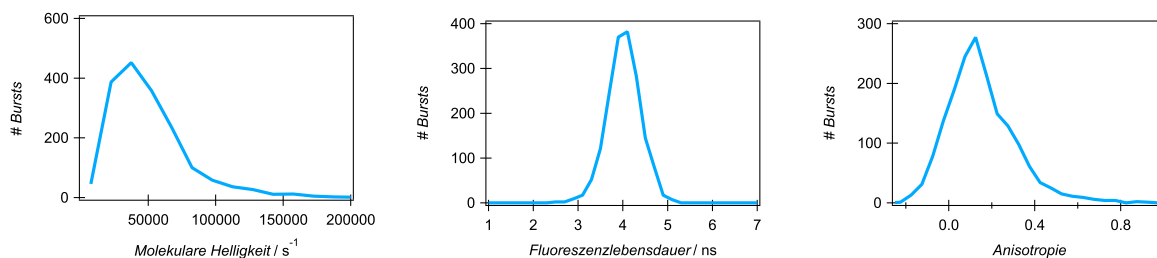


Abbildung 3.15.: **Beispielhafte Burstanalyse: Molekulare Helligkeit, Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie** Für denselben Datensatz wie in Abb. 3.14 wurden molekulare Helligkeit (links), Fluoreszenzlebensdauer (mittig) und Anisotropie (rechts) für alle mit der Analyseroutine gefundenen Bursts berechnet. Dass einzelne Bursts negative Werte für die Anisotropie aufweisen, liegt daran, dass insbesondere bei kleinen Bursts nur wenige Photonen zu dieser Messgröße beitragen, sodass es zu statistischen Verzerrungen kommen kann. Willkürlich in *ppol*- oder *spol*-Kanal auftretende Hintergrundphotonen können diesen Effekt zusätzlich verstärken. Analyseparameter:  $th=0.4$  ms,  $N_{min}=30$ ,  $N_{connect}=20$ .

Statt der simplen Differenz zwischen dem letzten und ersten detektierten Photon eines Bursts ergibt in dieser Auswertung die Halbwertsbreite des als im Idealfall gaußförmig angenommenen Bursts, der aus den Ankunftszeiten aller im Burst mit der mittleren Ankunftszeit  $t_{avg}^j$  detektierten Photonen resultiert, die Verweildauer  $\tau_{dwell}$  des beobachteten Peptids oder Aggregats im konfokalen Volumen. Dieser Ansatz wurde gewählt, um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass die exakten Grenzen des Bursts von der Wahl der Selektionsparameter  $th$  und  $N_{connect}$  (vgl. Absatz 3.3.2) abhängen, und um die Signifikanz des Ergebnisses zu erhöhen: Desto höher die Intensität des beobachteten



Bursts ist, desto sicherer ist seine Klassifizierung als Burst, oder anders ausgedrückt: Je weiter mittig sich die Photonen in einem Burst befinden, desto unwahrscheinlicher ist, dass sie nur versehentlich als Burstphotonen gezählt wurden. Aus diesem Grund wurde die zeitliche Verteilung der Photonen im Burst als gaußförmig angenommen und mit der Halbwertsbreite eine Größe bestimmt, die sicher innerhalb der Burstgrenzen liegt und sich verlässlich bestimmen lässt, selbst wenn der genaue Anfangs- und Endpunkt des Bursts unklar ist. Die Ergebnisse, die man dadurch erhält, decken sich mit der Diffusionszeit  $\tau_d$  durch das konfokale Volumen, die sich aus der Auswertung derselben Daten mittels FCS ergibt.

Bei der Berechnung der Anisotropie bezeichnen  $t_{rel,i}^{j,ppol}$  bzw.  $t_{rel,i}^{j,spol}$  die Relativzeiten der jeweils parallel bzw. senkrecht zum linear polarisierten Anregungslicht detektierten Photonen.

Aus der Berechnung der in Tabelle 3.3 aufgeführten Größen für jeden einzelnen Burst ergeben sich ihre jeweiligen Verteilungen für die detektierten Peptide bzw. Aggregate - beispielhafte Darstellungen anhand der Messung einer 4 h nach *pH9-Protokoll* aggregierten 40  $\mu\text{M}$  Atto488-A $\beta$ 40-Lösung mit DOL 5 % ist in den Abb. 3.14 und 3.15 zu sehen.

### 3.3.4. Darstellung von Oligomer-Verteilungen

Die in Abb. 3.14 und 3.15 gezeigten Verteilungen, die sich direkt aus der in Abschnitt 3.3.3 aufgeführten Charakterisierung der detektierten Bursts ergeben, machen allerdings die Größe und Häufigkeit der beobachteten Aggregate wenig greifbar. Aus diesem Grund wurde für die Darstellung der Größenverteilung beobachteter Oligomere die relative Photonenzahl  $N_{phot,rel} = N_{phot}/N_{phot,mon}$  gewählt; dabei ist  $N_{phot,mon}$  die mittlere Photonenzahl, die für eine reine Monommessung unter identischen Bedingungen beobachtet werden kann. Die relative Photonenzahl ist allerdings nicht gleichbedeutend mit der Größe des Aggregats: z.B. kennzeichnet  $N_{phot,rel}=2$  also nicht zwangsläufig ein Dimer. Das liegt daran, dass die genaue Photonenzahl sowohl von der Verweildauer im konfokalen Volumen - die je nach Diffusionspfad variieren kann - als auch von der Anzahl der Label eines aus gelabelten und ungelabelten Monomeren zusammengesetzten Aggregats abhängt. Dennoch erlaubt diese Darstellung die Unterscheidung unterschiedlich großer Oligomere und die Verfolgung ihres zeitabhängigen Auftretens (s. auch Kap. 4).

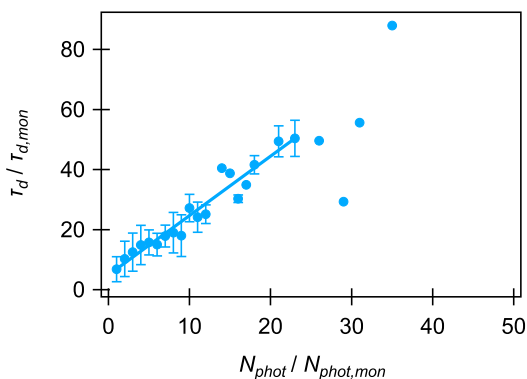


Abbildung 3.16.: **Verweildauer der Oligomere im konfokalen Volumen**  $\tau_d$  hängt linear von der Photonenzahl  $N_{phot}$  ab und kann zur Berechnung der Konzentration benutzt werden.

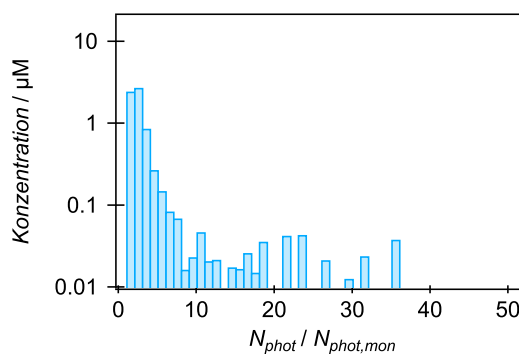


Abbildung 3.17.: **Größenverteilung der Oligomere** für den Beispieldatensatz einer 4 h nach *pH9-Protokoll* aggregierten Atto488-A $\beta$ 40-Lösung mit DOL 5 %.

Für alle Bursts, die sich unter einem bestimmten  $N_{phot,rel}$  zusammenfassen lassen, kann eine durchschnittliche Verweildauer  $\tau_d$  der durch diese Bursts erfassten Aggregate im konfokalen Volumen berechnet werden, die linear von  $N_{phot}$  abhängt, wie in Abb. 3.16 erkennbar. Mit Hilfe dieser mittleren Verweildauer  $\tau_d$  kann dann die apparente Konzentration der entsprechenden Oligomerspezies berechnet werden als [71]:

$$c = \frac{d\beta\tau_d}{\pi\omega_0^3 N_A} \quad (3.33)$$

Dabei ist  $d$  der Faktor, um den die Aggregationslösung für die Messung verdünnt wurde. Wurde statt einer starken Verdünnung ein sehr geringer DOL gewählt, um stets weniger als ein markiertes Peptid oder Aggregat im konfokalen Volumen zu beobachten, entspricht  $d$  dem DOL. Die Frequenz, mit der Oligomere mit einem bestimmten  $N_{phot,rel}$  auftreten, wird durch  $\beta$  bezeichnet,  $\omega_0$  ist die Breite des konfokalen Volumens und  $N_A$  die Avogadro-Konstante. Die Daten der in den Abb. 3.14 und 3.15 bereits gezeigten Messung resultieren damit in die in Abb. 3.17 dargestellte Oligomerverteilung. Der Mittelwert dieser Verteilung kann durch das erste Moment

$$\mu_1 = \overline{N_{phot,rel}} \quad (3.34)$$

berechnet werden, während die quadratische Wurzel des zweiten Moments

$$\mu_2^{1/2} = \left( \overline{N_{phot,rel}^2} \right)^{1/2} \quad (3.35)$$

die Breite charakterisiert.

### 3.4. Thioflavin T Assays

Eine weit verbreitete Methode zum Nachweis amyloider Fibrillen und der zeitlichen Beobachtung ihrer Entstehung sind sogenannte Fluoreszenztests (engl. *fluorescence assays*). Für diese Fluoreszenztests werden in Lösung befindliche Peptide oder Proteine mit einem Farbstoff gemischt, der bei Bindung an eine spezifische Struktur eine erhöhte Fluoreszenzintensität in Emissionsspektren zeigt. Farbstoffe, die bei Bindung an Amyloidfibrillen stärker fluoreszieren, sind beispielsweise Congo Red oder Thioflavin T (ThT). Letzteres zeigt bei Bindung an A $\beta$ -Fibrillen ein neues Anregungsmaximum bzw. eine deutlich gesteigerte Fluoreszenzintensität bei Anregung mit dieser Wellenlänge gegenüber freien ThT-Molekülen [95]. Deshalb wurde es in dieser Arbeit verwendet, um die Kinetik von der A $\beta$ -Fibrillierung abzubilden. Außerdem dient es zusammen mit Rasterkraftmikroskopieaufnahmen, die nach Abschluss der ThT Assays erstellt wurden, als Nachweis, dass sich mit der gewählten Präparations- und Inkubationsmethode Amyloidfibrillen bilden.

#### 3.4.1. Fluoreszenzverhalten von Thioflavin T

Thioflavin T besteht aus einem Benzothiazol- und einem Dimethylaminobenzolring, die über eine um den Winkel  $\phi$  drehbare C-C-Bindung miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 3.18a). Welche Eigenschaft genau dafür verantwortlich ist, dass ThT je nach Umgebung - im hier in der Arbeit gezeigten Fall primär die An- oder Abwesenheit von Amyloidfibrillen - eine unterschiedlich hohe Quantenausbeute zeigt, ist umstritten; häufig ist jedoch die Interpretation von ThT als molekularem Rotor, dessen Fluoreszenzeigenschaften von der Möglichkeit, um die C-C-Bindung zu drehen und Ladungen zu delokalisieren, abhängen. [96, 97, 98]

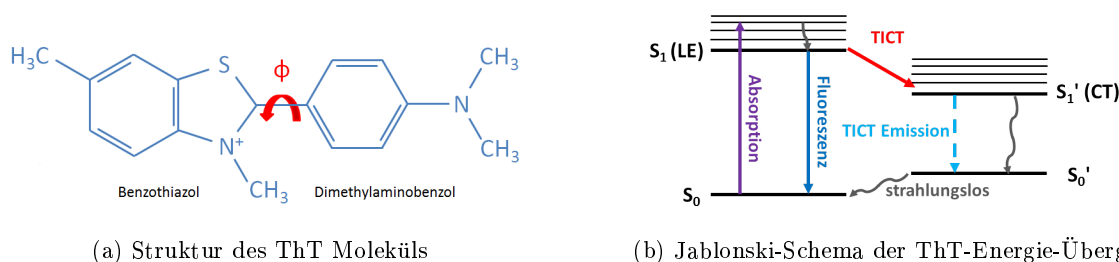


Abbildung 3.18.: Darstellung des ThT-Moleküls (a) und möglicher Übergänge zwischen Energieniveaus (b)

Im Energieminimum des Grundzustands  $S_0$  beträgt der Drehwinkel zwischen Benzothiazol- und Dimethylaminobenzolring  $\phi=37^\circ$ . Durch Absorption bei ca. 420 nm kann der Benzothiazolring in einen lokal angeregten Zustand (LE von engl. *locally excited*) überführt werden, in dem seine Ladung lokalisiert bleibt und weiterhin ein Drehwinkel von  $\phi=37^\circ$  vorliegt. Die Relaxation in den Grundzustand findet dann unter Emission eines Photons statt, das als Fluoreszenz beobachtet werden kann (vgl. Abb. 3.18b). In Konkurrenz zu diesem Prozess steht der sogenannte TICT-Übergang (von engl. *twisted internal charge transfer*). Unter Drehung des Moleküls hin zu  $\phi=90^\circ$  findet hierbei eine Delokalisation der Ladung der Benzothiazolgruppe statt, sodass das Molekül im sogenannten CT-Zustand (von engl. *charge transfer*) vorliegt, der das Minimum des ersten angeregten Singulettzustands  $S_1$  darstellt. Dieser Übergang erfolgt strahlungslos und auch der auf ihn folgende Übergang vom CT- in den Grundzustand ist primär emissionslos. Der TICT-Übergang dominiert bei freien Molekülen, sodass die Quantenausbeute bei Anregung des ThT-Moleküls gegen Null geht. Aus diesem Grund wird der CT-Zustand auch als Dunkelzustand bezeichnet. [96, 97, 98, 99]

Thioflavin T kann sich an Amyloidfibrillen binden, wobei es sich aber nicht um eine kovalente Bindung - wie es bei Fluoreszenzmarkierungen der Fall ist - handelt. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, sicher weiß man jedoch, dass ThT so an Fibrillen bindet, dass seine längste Achse parallel zur Fibrillenachse ausgerichtet ist. Eine mögliche Vorstellung geht davon aus, dass sich die ThT-Moleküle in Kanäle zwischen den Aminosäuren einfügen. Diese Kanäle resultieren aus der alternierenden Orientierung der Seitenketten der  $\beta$ -Stränge, die auf jeder Seite der  $\beta$ -Faltblätter ordentliche Reihen bilden, die in Richtung der Faltblätter zeigen. [99, 100]

Bei einer solchen Bindung an Amyloidfibrillen oder unter dem Einfluss anderer einschränkender Bedingungen - wie z.B. hoher Lösungsmittelviskosität - kann Thioflavin T nur noch eingeschränkt über den TICT-Übergang vom angeregten in den Grundzustand übergehen, da die Rotationsbewegung behindert wird. Die Nachbarschaft bestimmter Proteine stabilisiert außerdem die Ladung der Benzothiazolgruppe so, dass es auch bei Rotationsbewegungen nicht zur Delokalisation der Ladung und damit dem TICT-Übergang kommt. Durch beide Effekte steigt die Wahrscheinlichkeit für die von einer Photonemission begleitete direkte Rückkehr vom LE-Zustand in den Grundzustand, was in Ensemble-Messungen zu einer erheblich höheren Fluoreszenzintensität mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von ca. 480 nm führt. Zudem verschiebt sich auch das Absorptionsspektrum zu einem Maximum bei ca. 445 nm, einer Wellenlänge, bei der das freie ThT nur sehr wenig Photonen absorbiert. Eine Anregung des ThTs in diesem Bereich vergrößert deshalb nochmals den Unterschied in der beobachteten Fluoreszenzintensität für freies und an Amyloidfibrillen gebundenes ThT. [96, 97, 99, 101]

Die Fluoreszenzeigenschaften von ThT werden bei ThT Assays genutzt, um die Konzentration vorhandener Amyloidfibrillen bzw.  $\beta$ -Faltblatt-reicher Strukturen während eines Aggregationsprozesses zeitlich aufzulösen. Die beobachtete Fluoreszenzintensität hängt dabei linear von der Anzahl an ThT-Bindungsstellen und damit näherungsweise der Konzentration an Amyloidfibrillen ab [102]. Typischerweise ergibt sich dabei eine Fluoreszenzintensitätskurve wie in Abb. 3.19. Ob und wie stark die Wechselwirkung mit ThT die Aggregationskinetik selbst beeinflusst, hängt dabei von dem untersuchten Protein ab. Im Fall von A $\beta$  konnte für A $\beta$ 42 unterhalb einer ThT-Konzentration von 50  $\mu$ M kein Einfluss des ThTs auf zeitliche Kenngrößen der Aggregation wie  $t_{lag}$  oder  $t_{50}$  nachgewiesen werden, wohingegen es bei A $\beta$ 40 zu einer geringfügig beschleunigten Aggregation führt [102].

### 3.4.2. Präparation der Lösungen für ThT Assays

Für ThT Assays wurden die in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Lösungen mit 20  $\mu$ M Thioflavin T versetzt. Eine 2.5 mM ThT-Stammlösung in 25 mM Natriumphosphatpuffer inkl. 150 mM Natriumchlorid (pH 7.4, 4 °C, im Dunkeln aufbewahrt), wurde dazu durch einen 22  $\mu$ m-Filter gepresst, um etwaige Aggregate, die sich ggf. während der Lagerung bilden, zu entfernen, und anschließend 1:10 im gleichen Puffer verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden dann je 8 % des angestreb-

ten finalen Probenvolumen in *low-binding*-Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert.

Die Konzentrationen der A $\beta$ -Lösungen wurden 1.08-mal höher angesetzt als final benötigt und mit einem solchen Volumen zu den gefilterten, 1:10 verdünnten ThT-Lösungen gegeben, dass der Anteil der A $\beta$ -Lösungen 92 % des Gesamtvolumens betrug. Dabei wurde der pH-Wert der unter stark basischen Bedingungen präparierten A $\beta$ -Lösungen erst so spät wie möglich auf pH 7.4 korrigiert, um die Zeitspanne zwischen Beginn des Aggregationsprozesses und dem Start der ThT Assays so gering wie möglich zu halten. Insgesamt entstanden so Lösungen der gewünschten Konzentration bei pH 7.4 in 25 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid und 20  $\mu$ M ThT.

Von diesen Lösungen wurden je 150  $\mu$ l in eine Kavität einer Mikrotiterplatte (Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert; dabei wurden in der Regel drei bis vier Kavitäten mit derselben Lösung gefüllt, um Aussagen über Stochastik und Reproduzierbarkeit des Aggregationsprozesses treffen zu können. Es wurden sowohl *medium-binding*- als auch *low-binding*-96er-Mikrotiterplatten verwendet; eine Diskussion des Einflusses der Oberflächen des genutzten Mikrotiterplatten findet sich in Kapitel 5.2.

### 3.4.3. Aufnahme von Fibrillierungskinetiken

Um Fibrillierungskinetiken von A $\beta$ -Lösungen aufzunehmen, wurden die Ausgangslösungen wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben um 20  $\mu$ M Thioflavin T ergänzt und in mit Folie abgedeckten Mikrotiterplatten in einem FluoStar Omega Wellplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) inkubiert, wobei in der Regel Konzentrationsserien aufgenommen wurden und jede Ausgangslösung auf mindestens drei Wells aufgeteilt wurde, um bei der späteren Auswertung über ggf. vorhandene statistische Abweichungen mitteln zu können. Während der Inkubationszeit wurde in regelmäßigen Abständen die Fluoreszenzintensität des ThT detektiert. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt:

- Anregungswellenlänge: 450 nm
- Detektionswellenlänge: 480 nm
- 3 Anregungslichtblitze je Messpunkt, d.h. ein Messpunkt besteht aus einer Mittelung über drei unmittelbar hintereinander aufgenommenen Messungen
- Aufnahme eines Messpunktes alle 300 s bis 750 s - dass nicht alle Messungen die identischen Zeiträume zwischen den Messpunkten aufweisen, liegt daran, dass mit dem verwendeten Platerader maximal tausend Messpunkte aufgenommen werden können. Bei potentiell sehr langen Fibrillierungskinetiken wurde deshalb ein größerer Abstand zwischen den Messpunkten gewählt, um dennoch die gesamte Kinetik abbilden zu können.
- Schütteln: durchgehend entweder 0 rpm oder 400 rpm
- Inkubationstemperatur: entweder Raumtemperatur oder 37 °C
- Gain: 1000, sofern nicht anders angegeben (bei einzelnen Messungen bis 1500)

### 3.4.4. Makroskopische Analyse von ThT Assays

ThT Assays können sowohl im Hinblick auf eine makroskopische Beschreibung des Aggregationsprozesses ausgewertet werden als auch mit dem Ziel, Informationen über mikroskopische Größen wie die Anzahl der Monomere, die zur Bildung eines kritischen Keims benötigt werden, oder Elongations- und Keimbildungsraten zu gewinnen. Eine Analyse, die auf letzteres abzielt, greift dabei auf die Anwendung eines Aggregationsmodells zurück. Modelle, die zur Beschreibung der Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Peptids entwickelt wurden, werden in 2.2.3 detailliert vorgestellt und ihre Verwendung

in der Analyse eigener Messungen ausführlich in Kapitel 5 diskutiert.

Fibrillierungskinetiken weisen in der Regel entweder eine konkave oder eine sigmoidale Form auf. Erstere kann beobachtet werden, wenn die Proben bereits Keime (engl. *seeds*), also schon vorhandene Aggregate, enthalten, und kaum noch Keimbildungs- oder Fragmentierungsreaktionen stattfinden, sodass neue Fibrillenmasse primär durch Monomerassoziation entsteht. In diesem Fall hängt die Steigung der Fluoreszenzintensität, d.h. also die Generation neuer fibrillärer Strukturen, an die sich ThT binden kann, hauptsächlich von der Konzentration freier Monomere ab und verringert sich mit abnehmender Monomerkonzentration, was in die konkave Form des ThT Assays resultiert. Spielen im Aggregationsverlauf jedoch Keimbildungs- oder Fragmentierungsprozesse eine Rolle, beschleunigt sich das Wachstum der Fibrillenmasse zeitweilig trotz abnehmender Monomerkonzentration und der in Abb. 3.19 dargestellte s-förmige Verlauf kann beobachtet werden. [103]

Üblicherweise werden solche s-förmigen ThT Assays in Lag- (von engl. Verzögerung), Wachstums- und Plateauphase eingeteilt (vgl. Abb. 3.19). Die Lag-Phase stellt dabei die Zeit ab Beginn der Aggregation dar, die benötigt wird, damit sich ausreichend kritische Keime und sich daraus entwickelnde Aggregate bilden können, um eine für die Detektion in Ensemble-Messungen notwendige Konzentration zu erreichen. Während der Wachstumsphase steigt die Konzentration  $\beta$ -Faltblattreicher Aggregate dann massiv an, ehe sich in der Plateauphase ein Gleichgewichtszustand mit stabiler Monomer- und Fibrillenkonzentration herausbildet. [104]

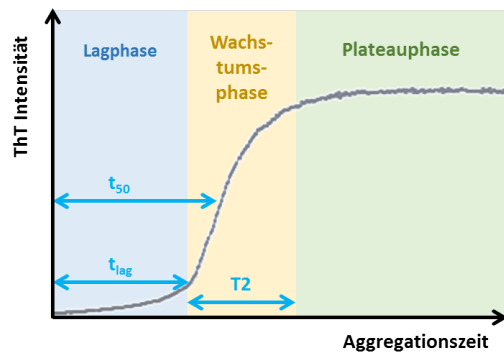


Abbildung 3.19.: **Typischer Verlauf eines sigmoidalen ThT Assays** Eingezeichnet sind die drei makroskopisch unterscheidbaren Phasen der Aggregation sowie die drei charakteristischen Zeiten  $t_{lag}$ ,  $t_{50}$  und  $T_2$ .

Während die in der Plateauphase erreichte Fluoreszenzintensität proportional zur gebildeten Fibrillenmasse ist, können Lagzeit  $t_{lag}$ , Halbwertszeit  $t_{50}$  und Übergangszeit  $T_2$  Aufschluss über die Größe der kritischen Keime für Primär- und ggf. Sekundärnukleation geben. Die Halbwertszeit  $t_{50}$  ist dabei definiert als die Zeit, nach der die Hälfte der maximalen Fluoreszenzintensität erreicht wurde. Um die Übergangszeit  $T_2$  zu erhalten, wird eine Tangente an die Stelle mit der maximalen Steigung gelegt, und die Differenz zwischen den Schnittpunkten dieser Tangente mit den Geraden zur Beschreibung von Lag- und Plateauphase gebildet. [104, 62]

Eine eindeutige Definition der Lagzeit existiert nicht; gleichwohl gibt es drei übliche Wege sie zu bestimmen [104]:

- als die Zeit, die benötigt wird, um einen bestimmten Prozentsatz - meistens 10% - der Maximalintensität zu erreichen
- als Schnittpunkt einer Tangenten, die die maximale Steigung während der Wachstumsphase beschreibt, mit der Basislinie, welche die Fluoreszenzintensität während der Lagzeit darstellt
- durch Anpassen einer s-förmigen Funktion

$$y = y_0 + \frac{A}{1 + \exp(-k(t - t_{50}))} \quad (3.36)$$

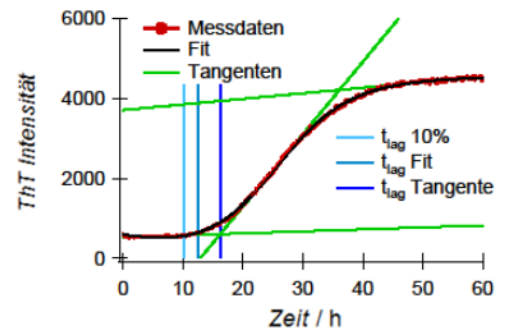


Abbildung 3.20.: **Beispielhafte Bestimmung der Lagzeit an einem ThT Assay** an  $10\mu\text{M}$  A $\beta$ 42WT bei  $37^\circ\text{C}$  ohne Schütteln.

mit

$$t_{lag} = t_{50} - \frac{k}{2} \quad (3.37)$$

Die letztgenannte Funktion dient dabei einer rein empirischen Beschreibung; prinzipiell kann jede beliebige s-förmige Funktion verwendet werden. [104] Die verschiedenen Möglichkeiten der Lagphasen-Bestimmung sind in Abb. 3.20 illustriert.

Da die in dieser Arbeit aufgenommenen ThT Assays in zudem eine Steigung in Lag- und Plateauphase aufweisen, wurde an sie eine entsprechend erweiterte sigmoidale Funktion

$$y = y_0 + mt + \frac{y_\infty + nt}{1 + \exp(-k(t - t_{50}))} \quad (3.38)$$

angepasst. Dabei beschreiben die Geradengleichungen  $y_0 + mt$  und  $y_\infty + nt$  das Fluoreszenz-Verhalten während Lag- bzw. Plateauphase,  $k$  ist die apparente Wachstumsrate während der Wachstumsphase und  $t_{50}$  die Zeit, nach der 50 % der Fluoreszenz-Intensität der Plateauphase erreicht wurden. Bisweilen wird die Plateauphase durch eine Geradengleichung nicht adäquat beschrieben, da beispielsweise sekundäre Aggregationsprozesse stattfinden oder die Fluoreszenz-Intensität abrupt abnimmt. In diesen Fällen wurde nicht über den gesamten Bereich der Messung gefittet, sondern der hintere Teil der Plateauphase, der sich mit einer Geradengleichung nicht mehr sinnvoll beschreiben lässt, nicht für die Funktionsanpassung berücksichtigt. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass Beginn und Ende der Wachstumsphase durch den Fit gut beschrieben werden und der Fit für das Ende der Lagphase, die Wachstumsphase und den Beginn der Plateauphase gut zu den tatsächlichen Daten passt: Aus den Kenngrößen dieses Bereichs werden später die makroskopischen Größen zur Bestimmung des Keimbildungsverhaltens abgeleitet. Dass der Fit späte Bereiche der Plateauphase nicht mehr stimmig beschreibt, wurde vor diesem Hintergrund vernachlässigt. Folgende makroskopische Kenngrößen der Aggregation wurden aus dem Fit abgeleitet [62, 99, 104]:

- $t_{lag} = t_{50} - 2/k$  ... Lagzeit
- $t_{plateau} = t_{50} + 2/k$  ... Beginn der Plateauphase
- $T2 = t_{plateau} - t_{lag}$  ... Länge der Wachstumsphase
- $L_{rel} = t_{lag}/T2$  ... relative Länge von Lag- und Wachstumsphase zueinander

Aus dem konzentrationsabhängigen Verhalten dieser Größen lassen sich Rückschlüsse über die Größen der kritischen Keime von Primär- und Sekundärnukleation ziehen; die Details dazu sind in Kapitel 2.2.3 dargestellt.

Um zeitliche Verschiebungen der Kinetik aufgrund von Konzentrationsänderungen deutlicher darzustellen, wurden die Messdaten auf den Plateauwert normiert. Für die Normierung der ThT Assays wurde jeder Datenpunkt der in [56] vorgestellten Methode folgend neu berechnet durch

$$y_{norm,i} = (1 - M_{0,frac}) \frac{y_i - y_{baseline}}{y_{plateau} - y_{baseline} + M_{0,frac}} \quad (3.39)$$

mit

- $y_i$  ... Originalmesswert für die ThT-Intensität
- $y_{norm,i}$  ... auf den Bereich 0...1 normierter Messwert
- $y_{baseline}$  ... Durchschnittswert der ThT-Intensität zu Beginn der Lagphase
- $y_{plateau}$  ... Durchschnittswert der ThT-Intensität während der Plateauphase
- $M_{0,frac}$  ... relativer Anteil an Aggregaten zu Beginn der Messung

Da durch Messungen in der Analytischen Ultrazentrifuge nachgewiesen wurde, dass die Inkubationslösungen bei Beginn der Aggregation ausschließlich Monomere enthalten, wurde  $M_{0,frac}$  für die Normierungen auf Null gesetzt. Die Normierungsfunktion wurde so implementiert, dass die Bereiche, in denen  $y_{baseline}$  und  $y_{plateau}$  bestimmt werden, durch Angabe der Messpunkte  $x_{baseline,1}$  und  $x_{baseline,2}$  bzw.  $x_{plateau,1}$  und  $x_{plateau,2}$  frei gewählt werden können: Alle Messwerte, die sich zwischen diesen beiden Messwerten innerhalb der Lag-Zeit bzw. Plateauphase befinden, werden für die Durchschnittsberechnung der Fluoreszenz-Intensität in Lag- bzw. Plateauphase herangezogen. Da bei höheren Konzentration ein Anstieg der ThT-Fluoreszenz innerhalb der Lagzeit beobachtet werden konnte, wurde nie die gesamte Lagzeit berücksichtigt, sondern stets nur die ersten vierzig Messpunkte, um diese Charakteristika der Aggregation nicht durch die Normierung zu unterdrücken. Auch in der Plateauphase wurde nicht immer ein konstant bleibendes Plateau beobachtet, sondern z.T. eine steigende oder sinkende Fluoreszenz-Intensität. Um auch dies zu berücksichtigen, wurden  $x_{plateau,1}$  und  $x_{plateau,2}$  so gewählt, dass die Durchschnittsbildung unmittelbar nach dem sicheren Erreichen der Plateauphase beginnt, aber schon endet, ehe sich ein eventuell vorhandener zusätzlicher An- oder Abstieg der ThT-Fluoreszenz auf die Mittelung auswirken kann. Deshalb können die Intensitätswerte während der Plateauphase auch für die normierten Daten im Einzelfall größer als eins sein.

### 3.4.5. Weiterführende Auswertung von ThT Assays

#### Bestimmung der Keimgrößen aus der Konzentrationsabhängigkeit makroskopischer Zeitgrößen

Gemäß den von *Knowles und Dobson* entwickelten Modellen zur Beschreibung der Aggregationskinetik des A $\beta$ -Peptids (s. auch Kap. 2.2.3) kann aus dem Potenzgesetz der doppelt-logarithmischen Auftragung von der Lagzeit  $t_{lag}$  bzw. der Halbzzeit  $t_{50}$  gegen die Konzentration die Größe von Primär- und Sekundärkeim der zugrunde liegenden Konzentrationsprozesse abgeschätzt werden [54]. Dabei gilt, dass sich die experimentell ermittelte Potenz  $\gamma$  zusammensetzt aus den Potenzen

$$nc1 = -2\gamma_1 \quad (3.40)$$

und

$$nc2 = -2\gamma_2 - 1 \quad (3.41)$$

die bei reiner Primär- bzw. Sekundärkeimbildung beobachtet werden könnten [54, 55]. Diese Zusammenhänge gelten basierend auf dem Modell ohne Berücksichtigung von Oligomeren. Eine auf ihnen basierende ausführliche Analyse von A $\beta$ 40-Daten in der Literatur wurde von *Meisl et al.* vorgelegt [55]. Bei Berücksichtigung von Oligomeren gilt hingegen

$$nc1 = -3\gamma_1 \quad (3.42)$$

für eine reine Primärkeimbildung und

$$nc2 = -3\gamma_2 - 1 \quad (3.43)$$

für eine reine Sekundärkeimbildung [26, 27].

Die bei der Auftragung von Halb- oder Lagzeit gegen die Konzentration apparente Potenz  $\gamma$  setzt sich aus  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  zusammen.

Auch die Konzentrationsabhängigkeiten der Länge der Wachstumsphase  $T_2$  und des Verhältnisses  $L_{rel}$  zwischen Lag- und Wachstumsphase ermöglicht die Berechnung der kritischen Nuklei von Primär- und Sekundärkeimbildung (s. auch Kap. 2.2.3). In diesem Fall erhält man die Größe des Primärkeims  $nc1$  durch

$$nc1 = 1 + nc2 - \gamma_{Lrel} \quad (3.44)$$

wobei  $\gamma_{Lrel}$  die Potenz ist, die sich aus der halb-logarithmischen Darstellung von  $L_{rel}$  gegen die Konzentration ergibt und  $nc2$  der Sekundärkeim, gegeben durch

$$nc2 = -1 - 2\gamma_{T2} \quad (3.45)$$

In diesem Fall handelt es sich bei  $\gamma_{T2}$  um die Potenz der doppelt-logarithmischen Auftragung von  $T2$  gegen die Konzentration. [62, 63]

### Analyse von ThT Assays mittels einer globalen Funktionsanpassung

Basierend auf den aktuellen Modellen von *Dear et al.* [26] und *Michaels et al.* [27] (vgl. auch Kap. 2.2.3) wurde für die globale Analyse von Konzentrationsserien die Funktion

$$f(t) = y_0 + \frac{1}{\frac{\lambda^3}{3\kappa^3} \exp(\kappa t) - 1 + 1} y_{plat} \quad (3.46)$$

verwendet. Die Parameter  $y_0$  und  $y_{plat}$  stehen dabei für den Offset zu Beginn der Messung aufgrund der Fluoreszenz von Thioflavin T im gelösten Zustand bzw. den nach Abschluss der Wachstumsphase erreichten Plateauwert. Für normierte Daten wurden  $y_0 = 0$  und  $y_{plat} = 1$  festgesetzt.  $\lambda$  beschreibt den primären Keimbildungsprozess mit

$$\lambda = kkk1 (2m_{tot}^{nc1})^{1/3} \quad (3.47)$$

und  $\kappa$  stellt den Sekundärpfad dar, der über

$$\kappa = kkk2 (2m_{tot}^{nc2+1})^{1/3} \quad (3.48)$$

gegeben ist. Beide enthalten als Parameter die Gesamtkonzentration an Monomeren  $m_{tot}$ , die für den globalen Fit auf die jeweilige initiale Monomerkonzentration gesetzt wurde. Dagegen waren  $nc1$ ,  $nc2$ ,  $kkk1$  und  $kkk2$  freie Parameter des globalen Fits, die als intrinsische mikroskopische Größen konzentrationsunabhängig für alle Assays identisch sein sollten. Die beiden Fitparameter  $kkk1$  und  $kkk2$  fassen jeweils die Geschwindigkeitskonstanten für Elongation  $k_+$ , Bildung eines primären bzw. sekundären Keims  $k_{01}$  bzw.  $k_{02}$  und dessen Konformationsänderung hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt-begünstigenden Struktur  $k_{conv}$  in einer einzigen Größe zusammen:

$$kkk1 = (k_+ k_{01} k_{conv})^{1/3} \quad (3.49)$$

$$kkk2 = (k_+ k_{02} k_{conv})^{1/3} \quad (3.50)$$

Auch die Ordnung der primären bzw. sekundären Keimbildungsreaktion  $n_{01}$  bzw.  $n_{02}$  und die Ordnung der Konformationsänderung  $n_{conv}$  werden jeweils in einem Fitparameter zusammengefasst:

$$nc1 = n_{01} + n_{conv} \quad (3.51)$$

$$nc2 = n_{02} + n_{conv} \quad (3.52)$$

Diese Zusammenfassung mehrerer mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten und Reaktionsordnungen in übergeordnete Parameter erwächst zum einen daraus, dass eine Unterscheidung der Einzelprozesse anhand von ThT Assays ohne weitere Modellannahmen oder ergänzende Experimente nicht sinnvoll möglich ist, und vermeidet zum anderen eine Überparametrisierung des globalen Fits. Geht es vor allem darum, die Beiträge von Primär- und Sekundärkeimbildung zur Fibrillenbildung zu unterscheiden, wird der in Gleichung 3.46 beschriebene globale Fit auf den Ausdruck

$$y(t) = \left( 1 - \frac{1}{\frac{\lambda^3}{3\kappa^3} (e^{\kappa t} - 1) + 1} \right) y_{plateau} + mt \quad (3.53)$$

reduziert, der nur noch die Parameter  $\lambda$  und  $\kappa$  enthält, die jeweils den Prozess der Fibrillenbildung initiiert durch Primär- bzw. Sekundärkeimbildung beschreiben [105]. Der Term  $mt$  wurde genutzt, um einen ggf. innerhalb der Lagphase vorhandenen Anstieg zu beschreiben.



### 3.5. Schnelle Differentielle Kalorimetrie an Flüssigkeiten (LFDSC)

#### 3.5.1. Konventionelle DSC und Flash DSC

Die Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC von engl. *Differential Scanning Calorimetry*) analysiert das Temperaturverhalten einer Probe, indem sie die Differenz des Wärmestroms zwischen der Probe und einer Referenz misst, der benötigt wird, um eine bestimmte Temperatur zu erreichen [106]. Dafür besitzen DSC-Geräte eine Probenkammer (indiziert mit S für *sample*) und eine Referenzkammer (abgekürzt mit R für *reference*), die entweder leer oder - bei Flüssigkeitsmessungen - mit dem Lösungsmittel, in dem sich die Probe befindet, gefüllt ist. Der Wärmefluss, der benötigt wird, um die Probe auf eine bestimmte Temperatur zu erhitzen, ergibt sich aus der spezifischen Wärmekapazität  $c_p$  der Probe, der Probenmasse  $m$  und der Heizrate  $\beta$  als

$$\Phi = \frac{dQ}{dt} = c_p m \beta \quad (3.54)$$

mit  $dQ/dt$  als pro Zeit ausgetauschte Wärme. Bei einem Phasenübergang wird entweder ein zusätzlicher Wärmestrom benötigt, wenn es sich um eine endotherme Reaktion handelt, oder aber ein geringerer bei einem exothermen Übergang. Dementsprechend wird der benötigte Wärmefluss zu

$$\Phi = \frac{dQ}{dt} = \left( c_p + \frac{d\alpha}{dT} \right) m \beta \quad (3.55)$$

wobei  $d\alpha/dT$  den Umsatz des thermischen Ereignisses bezeichnet und  $\Delta h$  die spezifische Umwandlungsenthalpie. Die Umwandlungsenthalpie der gesamten Probe

$$\Delta H = \int_a^b m \frac{d\alpha}{dT} \Delta h dT \quad (3.56)$$

ergibt sich dann als Integration über den Zusatzterm. [107]

Beide in dieser Arbeit verwendeten Kalorimeter sind leistungskompensierte Kalorimeter, d.h. die zugeführte Wärme wird gemäß dem Joul'schen Stromwärmegesetz  $Q = Pt$  durch eine entsprechende elektrische Leistung eingestellt. Diese Leistung  $P$  wird so nachgeregelt, dass stets die Bedingung  $T_S = T_R$  erfüllt ist, also die Temperatur  $T_S$  in der Probenkammer derjenigen in der Referenzkammer  $T_R$  entspricht. Gemessen wird dann die Wärmeflussdifferenz bzw. zugehörige Leistungsdifferenz

$$\Delta\Phi = k\Delta P = k(P_S - P_R) \quad (3.57)$$

Dabei ist  $k$  ein gerätespezifischer Proportionalitätsfaktor, der die Umrechnung der zugeführten Leistung in den Wärmefluss ermöglicht. [106] Die Heizraten eines Standard-DSCs liegen im Bereich von einigen Kelvin pro Stunde bis einigen Kelvin pro Minute. In dieser Arbeit wurde für konventionelle DSC-Messungen ein VP DSC Mikrok calorimeter (Malvern Panalytical, Malvern, UK) mit einer Heizrate von 60 K/h verwendet.

Im Gegensatz zu konventionellen DSCs können ultraschnelle Kalorimeter Heizraten von einigen 10000 K/s erreichen. Dadurch ermöglichen sie die Untersuchung sehr schneller Reorganisationsprozesse und die Erfassung von Nicht-Gleichgewichtszuständen. In dieser Arbeit kam für solche Messungen das Flash DSC 1 (Mettler Toledo, Columbus, USA) zum Einsatz, das Heizraten zwischen 0.5 K/s bis 40000 K/s im Temperaturbereich von 5 °C bis 500 °C erreicht und mit bis zu 4000 K/s kühlen kann. [108] Durch einen zuschaltbaren Intracooler (Huber Kältemaschinenbau, Offenbach, Deutschland) kann der Temperaturbereich auf bis zu -95 °C erweitert werden.

Derart hohe Heizraten sind nur möglich, wenn die Probenmenge sehr klein ist. Deshalb besitzt das Flash DSC keine integrierten Kammern wie ein konventionelles DSC, sondern wird mit Sensoren ausgestattet, die als eigenständige Kalorimetrieinheiten fungieren, die über das Flash DSC angesteuert und deren Daten über die interne Software des Flash DSC verarbeitet werden. [108]

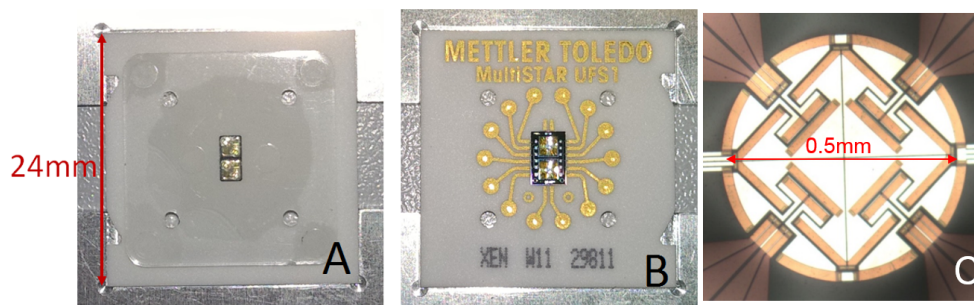


Abbildung 3.21.: **Sensor für Flüssigkeits-FDSC-Messungen** Zu sehen sind A) Vorderseite, B) Rückseite und C) aktive Fläche des Sensors. Auf der Vorderseite ist neben den beiden Membranen für Probe und Referenz die Kunststoffabdeckung zur Verringerung von Verdunstung sichtbar, auf der Rückseite befinden sich die Kontakte zur Ansteuerung und Messung durch das Flash DSC.

Für die Flüssigkeits-FDSC-Messungen wurden spezielle Flüssigkeitssensoren (XEN-39400liq, Xenosensor Integration, Delfgauw, Niederlande) benutzt, die sich allerdings zum Zeitpunkt der Messungen noch in Beta-Testphase befanden und nicht in großem Rahmen kommerziell erhältlich sind. Sie besitzen zwei Siliziumnitridmembranen, entsprechend Proben- und Referenzkammer in konventionellen DSCs, mit einer runden aktiven Membranfläche von 0.5 mm Durchmesser (vgl. Abb. 3.21). Eine Kunststoffabdeckung mit zwei winzigen Löchern zum Einfüllen der Probe bzw. der Referenzlösung verringert das Verdampfen während der Messung. Da nur ein geringer Teil des Gesamtvolumens überhaupt beheizt wird (vgl. Abb. 3.22), tolerieren die Sensoren Verdampfen jedoch bis zu einem gewissen Grad, ohne dass die Messung beeinflusst wird. Weil Gasblasen so auch entweichen können, während zugleich noch nicht verdampfte Flüssigkeit in den Membranbereich nachfließt, kann auch die Siedetemperatur der gemessenen Flüssigkeit um einige Grad überstiegen werden - kommt es auch im Bereich der aktiven Membran zum Flüssigkeits-Gas-Übergang, wird die Membran allerdings zerstört; gleiches gilt für die Kristallisation zu einem Feststoff. Für Wasser beträgt der messbare Temperaturbereich etwa 4 °C bis 150 °C. Die theoretisch im Flash DSC möglichen Heizraten können mit den Flüssigkeitssensoren nicht erreicht werden; sie sind auf Heizraten von 10 K/s bis 1000 K/s beschränkt. [109]

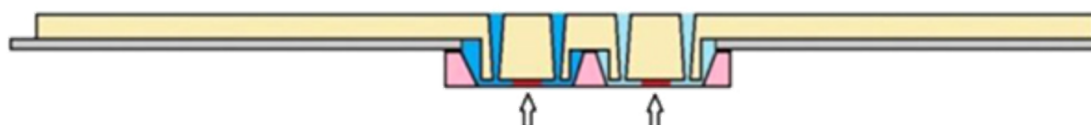


Abbildung 3.22.: **Schematische Seitenansicht des Sensors für Flüssigkeits-FDSC-Messungen** In der Kunststoffabdeckung (gelb) befinden sich vier Löcher, um die beiden Kammern für Proben- (dunkelblau) und Referenzlösung (hellblau) befüllen und durch Spülen mit Wasser und Luft säubern zu können. An der Unterseite befindet sich die Sensormembran, über die Probe und Referenz geheizt werden. Die Pfeile indizieren die aktive Sensorfläche und das tatsächlich beheizte Volumen ist rot gekennzeichnet und deutlich geringer als das Gesamtfüllvolumen von 1 µl. Die Abbildung wurde [30] entnommen.

### 3.5.2. Probenpräparation für (ultraschnelle) DSC-Messungen

Zur Etablierung von Flüssigkeits-FDSC-Messungen wurde mit wässrigen Lysozymbiosungen mit Konzentrationen zwischen 0.1 wt% und 10 wt% gearbeitet (vgl. Kap. 6.2). Dafür wurde getrocknetes aus Hühnereiweiß gewonnenes Lysozym (L7651, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in destilliertem Wasser mit einem Reinheitsgrad von 0.055 µS/cm gelöst und mit einer Pipette in die Probenkammer des Flüssigkeitssensors gefüllt, die Referenzseite dementsprechend mit destilliertem Wasser befüllt.

Für Vergleichsmessungen mit einem herkömmlichen Leistungsdifferenzkalorimeter wurde die Lysozymlösung zusätzlich vor Beginn der Messungen über Nacht gegen das gleiche destillierte Wasser dialysiert; die finale Konzentration, mit der gemessen wurde, betrug hier 0.35 wt%.

Für die Bestimmung der Thermostabilität von A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Aggregaten (vgl. Kap. 6.3) wurden Fibrillen nach dem in Abschnitt 3.1.2 vorgestellten *pH9-Protokoll* für 24 h bei 37 °C und 400 rpm aus Monomerlösungen mit einer Konzentration von 5 wt% erzeugt. Um auch die Monomere selbst zu untersuchen, wurden die entsprechenden Ausgangslösungen bei pH 9 möglichst rasch nach Lösen der Peptide im Flash DSC vermessen; hierbei wurden zusätzlich auch Monomerlösungen mit 10 wt% Konzentration untersucht, um ggf. ein höheres Messsignal zu erzeugen.

Um die Thermostabilität von Intermediaten, d.h. Oligomeren und Protofibrillen, zu messen, wurden A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 mit einer Konzentration von 5 wt% in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 9 mit 10 mM gelöst und für 6 h bei 37 ° und 400 rpm inkubiert; die Lösungen wurden möglichst direkt im Anschluss untersucht. Die verringerte Salzkonzentration und der erhöhte pH-Wert bewirken eine verlangsamte Aggregation, sodass es länger dauert, bis sich aus den Intermediaten Fibrillen bilden, und sich die Chance erhöht, eine für die Sensitivität der LFDSC-Messung ausreichende Konzentration an Oligomeren und Protofibrillen in der Probenlösung vorzufinden.

### 3.6. Absorptionsmessungen zur Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von A $\beta$ -Lösungen wurden Absorptionsmessungen eingesetzt. Das in allen untersuchten A $\beta$ -Varianten enthaltene Phenylalanin absorbiert UV-Licht mit einem Maximum bei 280 nm. Gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz ergibt sich aus der über eine bestimmte Weglänge  $d$  gemessenen Absorption  $A$  die Konzentration  $c$  durch:

$$A = \epsilon cd \quad (3.58)$$

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  kann direkt aus der Aminosäuresequenz bestimmt werden [110] und beträgt für die in dieser Arbeit verwendeten A $\beta$ -Varianten  $1490 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$  [111]. Aufgrund des Präparationsprotokolls (vgl. Kapitel 3.1.2) wurde die Peptidkonzentration für viele Messungen in 60 mM Natriumhydroxid mit einem pH-Wert von 12.8 bestimmt. In solchen Lösungen verschiebt sich das Maximum des Absorptionsspektrums zu einer Wellenlänge von ca. 293 nm, da das Tyrosin oberhalb von pH 10 protonisiert vorliegt. Der Wert für die Absorption wurde für in 60 mM Natriumhydroxid gelöstes A $\beta$  dementsprechend statt bei 280 nm bei 293 nm bestimmt. Alle aufgenommenen Absorptionsspektren zur Konzentrationsbestimmung wurden durch Abzug von bei identischen Bedingungen aufgenommenen Spektren des Puffers bzw. des Natriumhydroxids korrigiert.

Für gelabelte Peptide muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass der an sie gebundene Farbstoff ggf. ebenfalls bei 280 nm absorbiert. Um diesen Beitrag abzuziehen, wird bei einer 100 % gelabelten Probe, d.h. einer Probe, bei der jedes einzelne Peptid den entsprechenden Farbstoff trägt, die Absorption zusätzlich bei der Wellenlänge gemessen, bei der die Absorption des Fluorophors maximal ist. Aus dem Verhältnis der Absorption des Farbstoffs bei 280 nm im Vergleich zu derjenigen im Maximum, ergibt sich dann ein Korrekturfaktor  $CF = \frac{A_{280nm}}{A_{max}}$  für die Absorption bei 280 nm, und die Proteinkonzentration lässt sich berechnen als:

$$c = \frac{A_{280nm} - CF \times A_{max}}{\epsilon d} \quad (3.59)$$

Die Absorptionsspektren wurden entweder mit einem V-650 Spectrometer (Jasco, Pfungstadt, Deutschland) oder einem Specord S600 (Analytik Jena, Jena, Deutschland) aufgenommen. Dabei wurden 10 mm dicke Quarzküvetten (150.250QS, Hellma, Müllheim, Deutschland) verwendet. Für den Fehler in der Konzentrationsbestimmung wurden pauschal 5 % angenommen: Ein Unterschied von  $\Delta OD = 0.01$ , entspricht innerhalb des linearen Bereichs zwischen  $OD = 0.3$  und  $OD = 1$ , in dem hier gearbeitet wurde, einem Konzentrationsunterschied von 8  $\mu\text{M}$ . Bezogen auf die Gesamtkonzentration

der Ausgangslösung von mindestens 165  $\mu\text{M}$  ergibt sich daraus ein Fehler der Konzentrationsangabe von maximal 5 %.

### 3.7. Bildgebende Verfahren

Eine Abbildung der während eines Aggregationsprozesses des Amyloid- $\beta$ -Peptids entstandenen Aggregate ermöglicht zum einen eine Aussage über die Art der gebildeten Peptidzusammenlagerungen - etwa globuläre oder amorphe Strukturen, (Proto-)Fibrillen und fibrilläre Cluster - als auch die Betrachtung der Morphologie der entstandenen Amyloidfibrillen. In dieser Arbeit wurden dafür Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie eingesetzt. Erstere ermöglicht eine vollständigere Darstellung vorhandener Aggregatstrukturen, da die Probe recht schnell abgetastet werden kann und damit viele verschiedene Bereiche der Probe abgebildet werden können, wogegen letztere nur kleine Probenausschnitte sichtbar macht, die nicht zwingend repräsentativ sein müssen, dafür aber die Fibrillen detaillierter darstellt.

#### 3.7.1. Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird ein Elektronenstrahl mittels einer Kondensorlinse auf die Probe fokussiert und die Probeninformation, die sich aus den entweder ungestreut, inelastisch oder elastisch gestreut durch die Probe durchgehenden Elektronen ergibt, als 2D-Bild mittels einer Objektiv- und einer Projektorlinse auf einen Schirm projiziert. Aufgrund der im Vergleich zum sichtbaren Licht sehr viel geringeren Wellenlänge - 0.004 nm bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV - erzielen Elektronenmikroskope eine deutlich höhere Auflösung als einfache Lichtmikroskope. Es können Strukturen im Ångström-Bereich aufgelöst werden. [112]

Zur Untersuchung von Amyloidfibrillen ist Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bereits seit 1959 etabliert [113]. Um unter dem Elektronenmikroskop sichtbar zu sein, müssen sie allerdings negativ kontrastiert werden, d.h. auf einem Trägernetz (engl. *grid*) gebunden und mit Schwermetallatomen wie denen von Blei oder Uran umgeben werden, vor denen sie sich als helle Objekte abheben.

Die TEM-Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit einem EM900 (Zeiss, Jena, Deutschland) bei 80 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen.

#### 3.7.2. Rasterkraftmikroskopie

Bei der Rasterkraftmikroskopie (kurz AFM von engl. *atomic force microscopy*) tastet ein sogenannter Cantilever, d.h. eine Biegefeder mit einer Spitze daran, mittels Piezoelementen rasterförmig eine Probe ab. Dabei wird die Wechselwirkung zwischen der Spitze des Cantilevers und der Probe detektiert, um die Oberflächenbeschaffenheit der Probe abzubilden. Auf diese Weise können laterale Auflösungen im nm-Bereich erzielt werden. [114]

AFM kann in verschiedenen Modi betrieben werden: In dieser Arbeit wurde der *Intermittent Contact Mode*, auch *Tapping Mode* genannt, benutzt. In diesem Modus wird der Cantilever durch ein zusätzliches Piezoelement derart in eine Oszillationsbewegung versetzt, dass die Cantileverspitze bei jedem Schwingungszyklus kurz die Probenoberfläche berührt. Dabei wird die Höheneinstellung des Cantilevers so nachgeregelt, dass die Amplitude der Schwingung stets einen bestimmten, vom Benutzer festgelegten Wert, die sogenannte *Target Amplitude*, erreicht. Aus den Höheneinstellungen an den verschiedenen Rasterpunkten resultiert dann ein Höhenbild, das die Oberflächentopographie der Probe darstellt. [114]

Bei der Oszillationsbewegung zur Probe hin durchläuft der Cantilever drei Bereiche: zunächst einen, in dem keine Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze stattfindet, dann einen, in dem attraktive Wechselwirkungen durch van-der-Waals-Kräfte überwiegen, und schließlich einen repulsiven

Bereich. Stellt man die Oszillationsbewegung so ein, dass ihre Frequenz knapp unterhalb der Resonanzfrequenz des Cantilevers liegt, wird der attraktive Bereich sehr schnell durchlaufen und repulsive Kräfte dominieren die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe. Der Schwingungszustand wird dann netto-repulsiv genannt; in diesem Modus wurden alle in dieser Arbeit gezeigten AFM-Aufnahmen erstellt. Durch die Wechselwirkung der Spitze mit der Probe wird die Oszillationsbewegung des Cantilevers phasenverschoben. Diese Phasenverschiebung ist abhängig von den mechanischen Eigenschaften des Materials, in das die Spitze eindringt. Hart-Weich-Kontraste innerhalb der Probe können damit in einem Phasenbild sichtbar gemacht werden, wobei härtere Bereiche in einen höheren Phasenwert resultieren. [114] Amyloidfibrillen sind sowohl im Höhen- als auch im Phasenbild sichtbar.

Für die AFM-Abbildungen in dieser Arbeit wurde ein Multimode 8 (Bruker, Billerica, MA) genutzt. Die *Target Amplitude* des netto-repulsiven *Tapping Modes* betrug 500 mV, der *Peak Offset* 5 %. Letzterer ist ein Parameter, der beschreibt, wie weit die eingestellte Oszillationsfrequenz von der Resonanzfrequenz des Cantilevers abweicht. Für alle hier gezeigten Messungen wurden NSG30-Cantilever (NT-MDT Spectrum Instruments, Limerick, Ireland) eingesetzt, deren Resonanzfrequenz bei ca. 320 kHz liegt.

### 3.7.3. Probenpräparation für TEM- und AFM-Messungen

Um A $\beta$ -Aggregate, die sich im Verlauf des Aggregationsprozesses formen, mittels TEM und AFM darstellen zu können, wurde zum interessierenden Zeitpunkt der Fibrillierung ein Teil der Aggregationslösung mit einer Pipette abgenommen und auf ein Trägerobjekt transferiert.

Für TEM-Messungen wurden die Amyloidfibrillen und andere Aggregate an ein kupferbedampftes, mit Formvar beschichtetes Kupferträgernetz mit einer Maschengröße von 200 mesh (Ted Pella, Redding, CA) gebunden und mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Dafür wurde analog zu bereits etablierten Protokollen vorgegangen [115]: 5  $\mu$ l A $\beta$ -Lösung werden auf ein Trägernetz getropft und nach drei Minuten Wartezeit zunächst 60 s in Wasser gewaschen und dann 60 s in 1 % (w/v) Uranylacetat getaucht. Die überschüssige Flüssigkeit wird mithilfe eines Papiers abgesaugt und das Trägernetz vor Gebrauch an der Luft getrocknet.

Für AFM-Messungen wurden 10  $\mu$ l der Aggregationslösung auf ein frisch gespaltenes Mica-Plättchen (V1-Grad, 10 mm Durchmesser, Ted Pella) gegeben und das Mica-Plättchen nach einer Minute Wartezeit, während derer die in der Lösung befindlichen größeren Aggregate sich an der Mica-Oberfläche anlagern können, vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, um überschüssige Puffersalze zu entfernen. Anschließend wurde die Probe an der Luft getrocknet.

## 3.8. Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ermöglicht es, Partikel in einer Lösung aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens nach Gewicht zu separieren und zu charakterisieren. Dafür wird eine Zelle mit der zu untersuchenden Lösung mit hohen Geschwindigkeiten von mehreren zehntausend Umdrehungen pro Minute rotiert. Auf diese Weise können auch Proteine und Proteinaggregate untersucht werden. Dabei lässt die Zentrifugalkraft die (aggregierten) Proteine im Verlauf der Messung Richtung Zellboden, der sich außen befindet, wandern, wobei eine Trennung nach Molekulargewicht stattfindet, da die Proteine bzw. Proteinaggregate umso schneller sedimentieren, je schwerer sie sind. Der Zentrifugalkraft wirken Auftriebskraft und Reibung entgegen, wobei letztere vom Lösungsmittel abhängt.

Während der Ultrazentrifugation wird beständig in zuvor festgelegten Zeitintervallen durch Absorptionmessungen die Konzentration der gelösten Partikel in Abhängigkeit des Zellradius gemessen und der Verlauf der Sedimentationsfront beobachtet. Darüber kann der Sedimentationskoeffizient

s als

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{dr_{bnd}/dt}{\omega^2 r} \quad (3.60)$$

berechnet werden, wobei  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit des Rotors darstellt und  $r$  den Abstand der Zelle zur Rotorachse. Bei  $u$  handelt es sich um die Sedimentationsgeschwindigkeit, die der zeitlichen Veränderung  $dr_{bnd}/dt$  des Radius  $r_{bnd}$  entspricht. Der Radius  $r_{bnd}$  ist dabei derjenige, an welchem sich der Wendepunkt der im Idealfall sigmoidalen Kurve befindet, die sich aus der radiusabhängigen Konzentrationsmessung ergibt.

Im einfachsten Fall kann das Molekulargewicht  $M$  der beobachteten Partikel dann über die Svedberg-Gleichung determiniert werden:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad (3.61)$$

Dabei ist  $R$  die universelle Gaskonstante,  $T$  die Temperatur,  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $\bar{v}$  das spezifische Partialvolumen des sedimentierenden Partikels und  $\rho$  die Dichte des Lösungsmittels. [116] Diese Gleichung gilt allerdings nur für kugelförmige Objekte und ist für Proteine damit nur begrenzt gültig. Deshalb wird stattdessen die radiale Veränderung der Konzentration bestimmt und das apparente Molekulargewicht als

$$M_{app} = \frac{RT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \frac{d(\ln c)}{dr^2} \quad (3.62)$$

berechnet [117]. Dabei ist  $c$  die gemessene Konzentration. Das spezifische Partialvolumen  $\bar{v}$  eines Peptids oder Proteins ergibt sich aus der Mittelwertbildung über die spezifischen Partialvolumina der einzelnen Aminosäuren. In guter Näherung kann dabei für jedes Peptid  $\bar{v} = 0.73$  ml/g angenommen werden, da das spezifische Partialvolumen keiner Aminosäure mehr als 5% von diesem Wert abweicht.

Für diese Arbeit wurden Messungen mit einer Optima XL-A Zentrifuge mit 8-Loch-Rotor AnTi50 (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) durchgeführt. Während der Messungen wurden in den ersten fünf Stunden alle zehn Minuten Absorptionsdaten in Abhängigkeit des Zellradius aufgenommen, dann etwa einen Tag lang stündlich und von da alle fünf Stunden bis zum Abschluss der Messung. Die Messungen wurden anschließend mit der Software Sedfit [118] ausgewertet.

# 4. Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von A $\beta$ -Oligomeren

## 4.1. Einleitung und Fragestellung

Gemäß der Oligomer-Hypothese stellen Oligomere diejenigen neurotoxischen Aggregate des A $\beta$ -Peptids dar, die in die Entstehung von Alzheimer involviert sind [9, 119]. Ihre experimentelle Untersuchung wird jedoch erschwert durch die hohe Heterogenität ihres Auftretens hinsichtlich z.B. Größe, Stabilität und Sekundärstruktur [21, 120], die starke Abhängigkeit ihrer Entstehung von äußeren Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur oder Konzentration in der Lösung [13, 121] und die geringen Konzentrationen im pico- bis nanomolaren Bereich, in denen sie üblicherweise auftreten [122, 123, 124]. Ein wichtiger experimenteller Ansatz, um trotz der geringen Konzentrationen eine Oligomercharakterisierung leisten zu können, ist die Verwendung von Fluoreszenz-basierter Methoden wie bspw. Photobleaching [14], FCS [15, 125], TCCD [18, 126] oder FRET [127]. Dabei wird davon ausgegangen, dass die dafür notwendige Markierung des A $\beta$ -Peptids am N-Terminus mit einem Fluorophor den Aggregationsprozess - und damit auch die beobachteten Oligomere - nicht beeinflusst: Als loses, ungeordnetes Ende, das nicht in die spätere Faltblattstruktur der Amyloid-Fibrillen eingebaut wird, wird ihm nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben [17, 18, 19].

Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse numerischer Simulationen, mit denen gezeigt wurde, dass die Addition eines Fluorophors dem Hinzufügen eines großen hydrophoben Oberflächenflecks mit einem großen attraktiven Potentialtopf entspricht, der die Konditionen, unter denen Phasenübergänge stattfinden, verschiebt; dieser Effekt konnte bereits bei sehr geringen Anteil markierter Peptide beobachtet werden [128]. Und tatsächlich wurden für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in Folge von Mutationen am N-Terminus bzw. die Markierung durch einen Fluorophor ein hinsichtlich Kinetik und Dynamik veränderter Aggregationsprozesses nachgewiesen [20, 129, 70].

Welchen Einfluss hat also die Markierung des A $\beta$ -Peptids mit einem Fluorophor am N-Terminus auf die Bildung von Oligomeren? Unterscheidet dieser sich je nach verwendetem Fluorophor? Und mit welchen Parametern kann er ggf. charakterisiert werden?

Um diese Fragen zu beantworten, wird im Folgenden der Einfluss der vier kommerziell erhältlichen und gebräuchlichen Fluorophore Atto488, Atto655, HiLyte488 und HiLyte647 auf die Bildung von A $\beta$ 40-Oligomeren mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dazu soll zunächst die Fibrillierung des ungelabelten A $\beta$ 40 durch das gewählte Inkubationsprotokoll mittels ThT Assay sowie TEM- und AFM-Aufnahmen der entstandenen Fibrillen nachgewiesen und dieses anschließend auf die gelabelten Peptide übertragen werden. Die Größenverteilungen der Oligomerpopulationen werden für alle vier Fluorophore mittels der in 3.3 vorgestellten Burst-Analyse charakterisiert und mögliche Wechselwirkungen der Fluorophore durch Betrachtung von Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie untersucht. Abschließend sollen zusätzlich die Größenverteilungen der Oligomere von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 miteinander verglichen werden. Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden großteils auch in [71] publiziert und dieses Kapitel basiert auf dieser Publikation.

## 4.2. Nachweis der Fibrillierung von gelabeltem A $\beta$ 40

Ungelabeltes A $\beta$ 40 zeigt bei Inkubation mittels des bereits etablierten *pH9-Protokolls* (s. 3.1.2 sowie [20]) in ThT Assays den für die Entstehung von Amyloid-Fibrillen typischen sigmoidalen Anstieg der ThT Fluoreszenz und bildet lange, dünne, leicht gedrehte Fibrillen (vgl. Abb. 4.1). Die im AFM-Bild sichtbaren Fibrillen besitzen dabei eine Breite von etwa 20 nm und eine Höhe von ca. 5 nm. Neben einzelnen stark gedrehten Fibrillen dominieren dabei Strukturen, bei denen sich die Verdrillung alle 120 nm wiederholt.

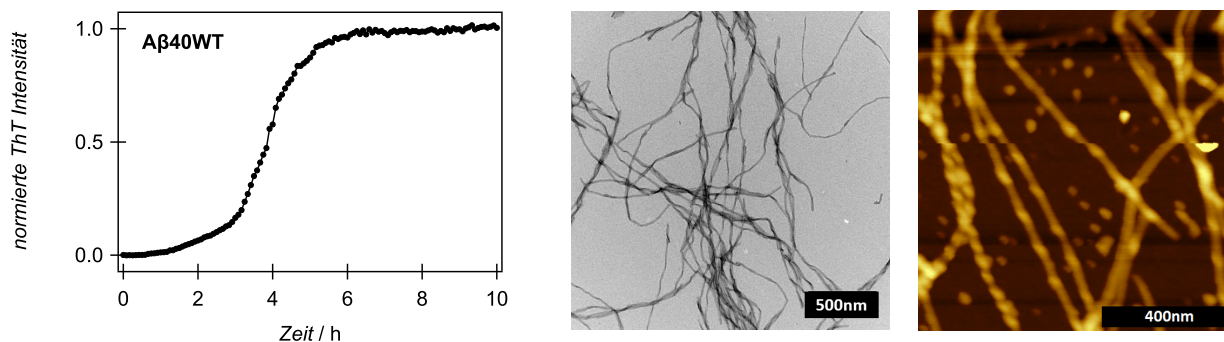


Abbildung 4.1.: **Nachweis der Aggregation des A $\beta$ 40-Peptids** Bei Aggregation des A $\beta$ 40WTs nach dem gewählten *pH9-Protokoll* können sowohl der für die Fibrillierung von Amyloiden typische sigmoidale ThT Assay Verlauf beobachtet werden (links) als auch lange, dünne Fibrillen auf TEM- und AFM-Aufnahmen (mittig und rechts), die nach 24 h Inkubation aufgenommen wurden.

Auch mit einem DOL von 3-5 % gelabeltes A $\beta$ 40 bildet unter den gleichen Präparationsbedingungen Fibrillen, deren Morphologie allerdings nur im Fall von Atto488-A $\beta$ 40 und HL488-A $\beta$ 40 derjenigen des Wildtyps ähnelt (vgl. Abb. 4.2). HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 hingegen bilden deutlich kürzere, dünnere und stärker gekrümmte Fibrillen. Ein Vergleich von Atto488-A $\beta$ 40 und Atto655-

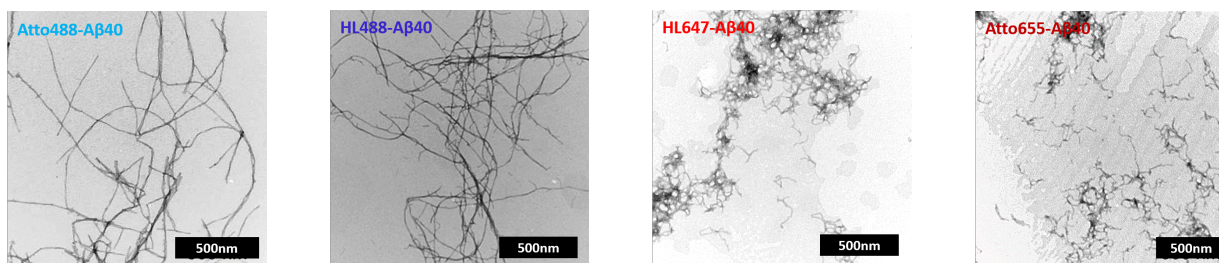


Abbildung 4.2.: **Morphologie gelabelter A $\beta$ 40-Fibrillen** Nach 24 h Inkubation konnten bei Markierung mit jedem der vier Fluorophore Fibrillen nachgewiesen werden. Der DOL der Aggregationslösungen betrug dabei 3-5 % und die Konzentration ca. 40  $\mu$ M. Während allerdings für Atto488-A $\beta$ 40 und HL488-A $\beta$ 40 lange, nur leicht gebogene Fibrillen beobachtet wurden, die denjenigen des Wildtyps ähneln, bilden HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 deutlich dünnere, kürzere und sehr viel stärker gebogene Fibrillen.

A $\beta$ 40 mittels AFM (vgl. Abb. 4.3) zeigt zudem, dass bei letzterem zusätzlich amorphes Material entsteht.



Die beobachteten Veränderungen der Morphologie deuten darauf hin, dass zumindest HL647 und Atto655 tatsächlich den Aggregationsprozess modifizieren. Untersuchungen der Fibrillen mittels Röntgenweitwinkelstreuung zeigten jedoch keine Veränderung der Einheitszelle der Fibrillenstruktur; stattdessen wirken sich die Fluorophore auf die laterale Anordnung der Fibrillenbündel aus und führen damit zu der veränderten Morphologie [71].

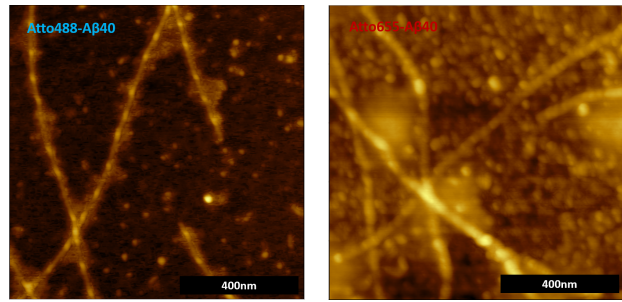


Abbildung 4.3.: **AFM-Aufnahmen gelabelter Aβ40-Fibrillen** Während bei Atto488-Aβ40 nach 24h Inkubation relativ gerade lange Fibrillen abgebildet wurden, ist bei Atto655-Aβ40 zusätzlich amorphes Material sichtbar.

### 4.3. Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren

#### 4.3.1. Einfluss der Fluorophore auf die Größenverteilung der Aβ40-Oligomere

Um den Effekt der N-Terminus-Markierung auf die Bildung von Oligomeren zu untersuchen, wurden mittels Burst-Analyse von smFS-Messungen die Größenverteilungen der Oligomerpopulationen quantifiziert.

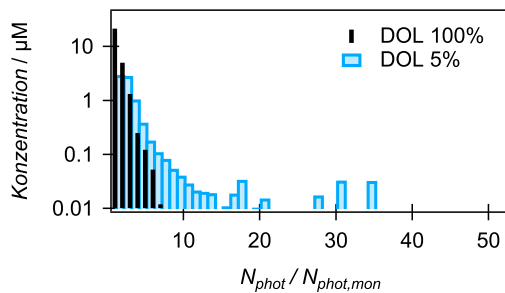


Abbildung 4.4.: **Einfluss des DOL auf die Beobachtung von Oligomeren** smFS-Messungen an Atto488-Aβ40-Lösungen mit einer Konzentration von 40 μM nach 4h Inkubation. Die Verringerung des DOL ermöglicht die Beobachtung von HMW-Oligomere.

Dazu wurden mit einem DOL von 5 % markierte Aβ40-Lösungen mit einer Konzentration von 40 μM für alle vier Fluorophore jeweils 24 h inkubiert. Der geringere DOL von 5 % steigert gegenüber Messungen an ausschließlich markierten Peptiden (d.h. DOL 100 %) die Wahrscheinlichkeit, insbesondere größere Oligomere (im Folgenden: HMW-Oligomere von engl. *high molecular weight*) zu beobachten, da die Peptidkonzentration während der Messungen durch den Anteil unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht sichtbarer unmarkierter Peptide erhöht werden kann. Abb. 4.4 zeigt einen Vergleich zwischen den Oligomer-Größenverteilungen einer vollständig und einer zu nur 5 % markierten Atto488-Aβ40-Probe nach 4 h Inkubation. Während bei der vollständig markierten Probe während der einstündigen Messzeit ausschließlich kleinere Oligomere mit einer relativen Photonenzahl  $N_{phot}/N_{phot,mon} < 10$  beobachtet werden konnten, wurden bei der Probe mit einem DOL von 5 % auch größere HMW-Oligomere detektiert, wobei als HMW-Oligomere alle Oligomere mit  $N_{phot}/N_{phot,mon} > 10$  bezeichnet werden, alle kleineren als LMW-Oligomere (von engl. *low molecule weight*).

In Abbildung 4.5 sind die Oligomerverteilungen für alle vier Peptide dargestellt nach 4 h Inkubation, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine oder kaum Fibrillen in der Lösung vorhanden sind (s. Abb. A.1 in Anhang A.1), und nach 24 h, wenn in ThT Assays die Plateauphase lange erreicht ist und in TEM-Abbildungen Fibrillen nachweisbar sind (vgl. Abb. 4.2). Mittelwerte und Breiten der Verteilungen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Nach 4 h weist die Oligomerverteilung von Atto488-Aβ40 den geringsten Mittelwert von 2.7  $N_{phot,mon}$  auf und ist mit einer Breite von 4.7  $N_{phot,mon}$  zudem die schmalste der vier Verteilungen.<sup>1</sup> Nach 24 h hat sich dieser Mittelwert zu 0.5  $N_{phot,mon}$  verschoben bei einer sehr geringen Verteilungsbreite

<sup>1</sup>Als Mittelwert wird hier das erste Moment  $\mu_1$  berechnet. Als Maß für die Breite wird die Wurzel des zweiten Moments  $\mu_2^{1/2}$  angegeben.

von nur  $0.8 N_{phot,mon}$ . Ein ähnliches Bild, wenn auch mit etwas größeren Verteilungsbreiten und einem etwas höheren Mittelwert insbesondere nach 4h ergibt sich für HL488-A $\beta$ 40: Hier betragen Mittelwert und Breite nach 4h  $4.1 N_{phot,mon}$  bzw.  $6.3 N_{phot,mon}$ , nach 24h hingegen nur noch  $1.0 N_{phot,mon}$  bzw.  $1.1 N_{phot,mon}$ .

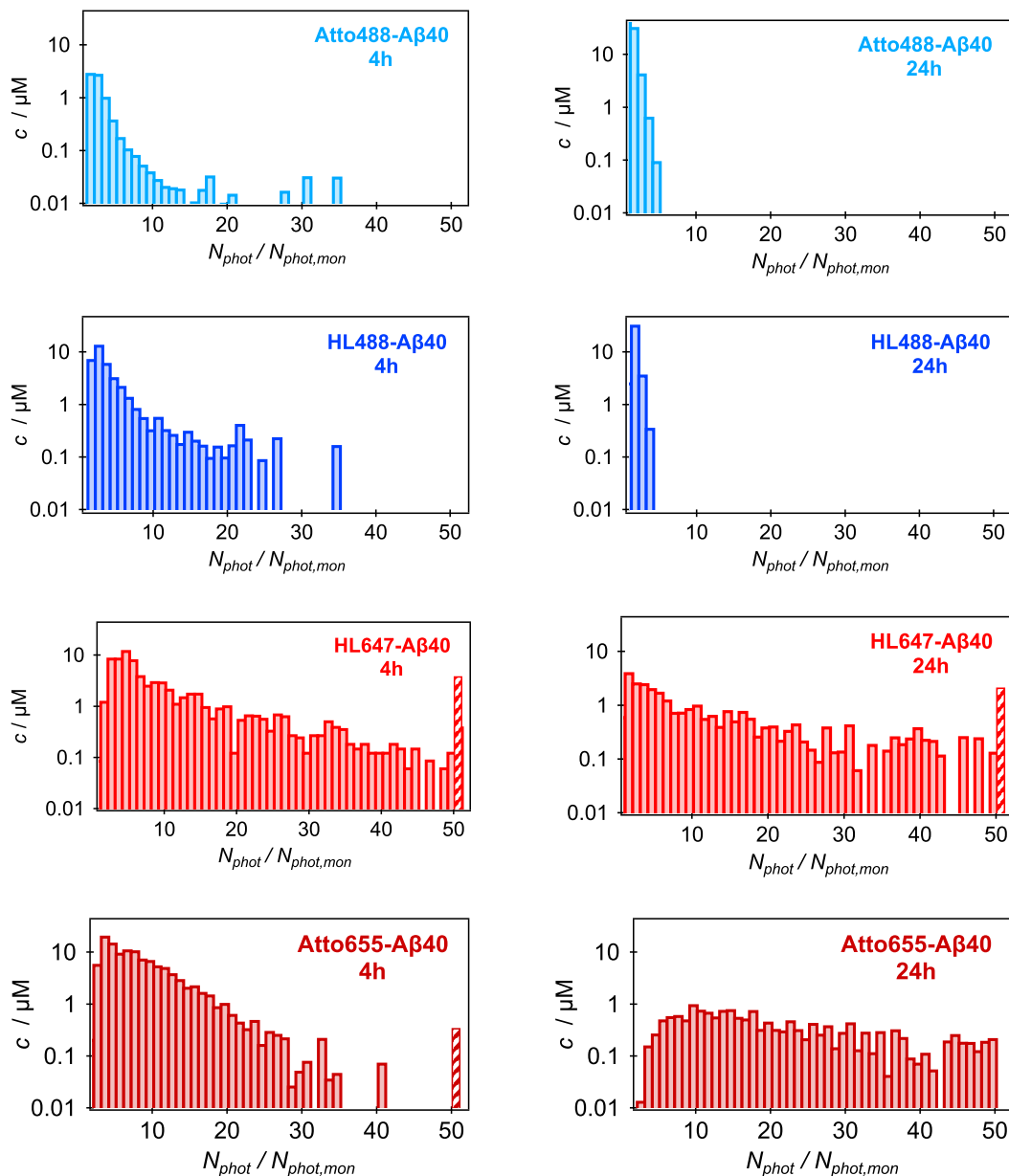


Abbildung 4.5.: **Einfluss des Fluorophors auf die Größenverteilung der Oligomere** Gezeigt werden jeweils die Größenverteilungen nach 4h Inkubation und nach 24h bei einem DOL von 5% und einer Konzentration von  $40 \mu\text{M}$ . Nach 4h unterscheiden sich diese Verteilungen insbesondere im Bereich größerer Oligomere. Auch nach 24h können im Fall von HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 noch HMW-Oligomere beobachtet werden, nicht aber für die anderen beiden Fluorophore. Alle Oligomere mit  $N_{phot,rel} > 50$  wurden in einem kursiv schraffierten Balken zusammengefasst.

In doppeltem Kontrast dazu stehen die Oligomerverteilungen von HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40: Zum einen entstehen bei der Aggregation dieser beiden Peptide innerhalb der ersten vier Stunden erheblich mehr HMW-Oligomere, darunter auch sehr große mit  $N_{phot,rel} > 50$ . Dies schlägt sich auch in Mittelwerten und Breiten der Verteilungen nieder: Die Größenverteilung der Oligomere von HL647-A $\beta$ 40 hat einen Mittelwert von  $10.6 N_{phot,mon}$  bei einer Breite von  $14.9 N_{phot,mon}$ , die von

### 4.3. EINFLUSS VON FLUOROPHOREN AUF DIE BILDUNG VON OLIGOMEREN

Atto655-A $\beta$ 40 ist mit einem Mittelwert von  $7.4 N_{phot,mon}$  und einer Breite von  $8.8 N_{phot,mon}$  etwas schmaler und zu kleineren Oligomeren verschoben. Zum anderen sind die HMW-Oligomere auch nach 24 h noch vorhanden. Die Größenverteilung der HL647-A $\beta$ 40-Oligomere nach 24 h unterscheidet sich mit einem Mittelwert von  $11.2 N_{phot,mon}$  und einer Breite von  $16.3 N_{phot,mon}$  kaum von derjenigen nach 4 h. Die Größenverteilung für Atto655-A $\beta$ 40 verschiebt sich sogar zu einem größeren Mittelwert von  $19.7 N_{phot,mon}$  mit einer Breite von  $23.1 N_{phot,mon}$ . Auffällig ist hier, dass die Zahl der HMW-Oligomere nach 24 h nochmals zugenommen hat, wohingegen die Zahl der LMW-Oligomere geringer geworden ist.

Peptid	nach 4h		nach 24h	
	$\mu_1$	$\mu_2^{1/2}$	$\mu_1$	$\mu_2^{1/2}$
Atto488-A $\beta$ 40	$2.7 \pm 0.2$	$4.7 \pm 0.4$	$0.5 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$
HL488-A $\beta$ 40	$4.1 \pm 0.2$	$6.3 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$
HL647-A $\beta$ 40	$10.6 \pm 0.2$	$14.9 \pm 0.4$	$11.2 \pm 0.2$	$16.3 \pm 0.4$
Atto655-A $\beta$ 40	$7.4 \pm 0.2$	$8.8 \pm 0.4$	$19.7 \pm 0.2$	$23.1 \pm 0.4$

Tabelle 4.1.: **Größenverteilungen der Oligomere gelabelter A $\beta$ -Peptide**  $\mu_1$  gibt den Mittelwert der Verteilung an,  $\mu_2^{1/2}$  ist ein Maß für die Breite. Sie wurden gemäß den Gleichungen 3.34 und 3.35 berechnet.

Welche Rückschlüsse lassen sich aus diesen Resultaten ziehen? Zum einen scheinen bei Atto488-A $\beta$ 40 und HL488-A $\beta$ 40 die Oligomere nach 24 h weitgehend für die Fibrillenbildung verbraucht und neben den bei A $\beta$ 40 in smFS-Messungen nur in sehr vereinzelt Messungen sichtbaren Fibrillen primär Monomere vorhanden zu sein. Das spricht dafür, dass es sich bei den nach 4 h beobachteten eher kleineren Oligomeren um *on-pathway*-Oligomere handelt. Die für HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 in großer Zahl beobachteten HMW-Oligomere sind hingegen *off-pathway*, da sie auch nach 24 h, d.h. nach Abschluss der Fibrillierung, noch vorhanden sind. Bei Atto655-A $\beta$ 40 könnten ggf. sogar Fraktionen von *on-pathway*- und *off-pathway*-Oligomeren unterschieden werden, da sich die Zahl an LMW-Oligomeren nach 24 h deutlich reduziert hat. Gegebenenfalls handelt es sich bei der in AFM-Aufnahmen (vgl. Abb. 4.3) sichtbaren amorphen Masse um die hier beobachteten *off-pathway*-Oligomere.

Dass die *off-pathway*-Oligomere nur für die beiden Fluorophore HL647N und Atto655 beobachtet werden, spricht dagegen, dass es sich bei der Generation von *off-pathway*-Oligomeren um eine der A $\beta$ 40-Aggregation unter den gewählten Inkubationsbedingungen inhärente Eigenschaft handelt. Stattdessen weist es daraufhin, dass die Bildung dieser Oligomere durch die Farbstoffe selbst induziert wird, womit es streng genommen gar keine Oligomere im Sinne eines Produkts oder Intermediats der Peptidaggregation wären.

#### 4.3.2. Interaktionen der verwendeten Fluorophore

##### Auswirkung der Hydrophobizität auf die Bildung von Oligomeren

Einen Hinweis auf den hinter der farbstoffabhängigen Generation von HMW-Oligomeren liegenden Mechanismus kann die Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer geben. Sie kann als Indikator für Interaktionen mit umgebenden Molekülen gesehen, da sie in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen in unterschiedlichem Maße gelöscht wird. Beispielsweise wurde gezeigt, dass räumlich zueinander nahe Fluorophore in Fibrillen aufgrund des Förster-Mechanismus fluoreszenzlöschend

wirken können und damit - skalierend mit dem Fibrillenwachstum - zu einer verringerten Fluoreszenzlebensdauer führen [13]. Doch welche Veränderungen zeigen sich bei der Bildung von Oligomeren?

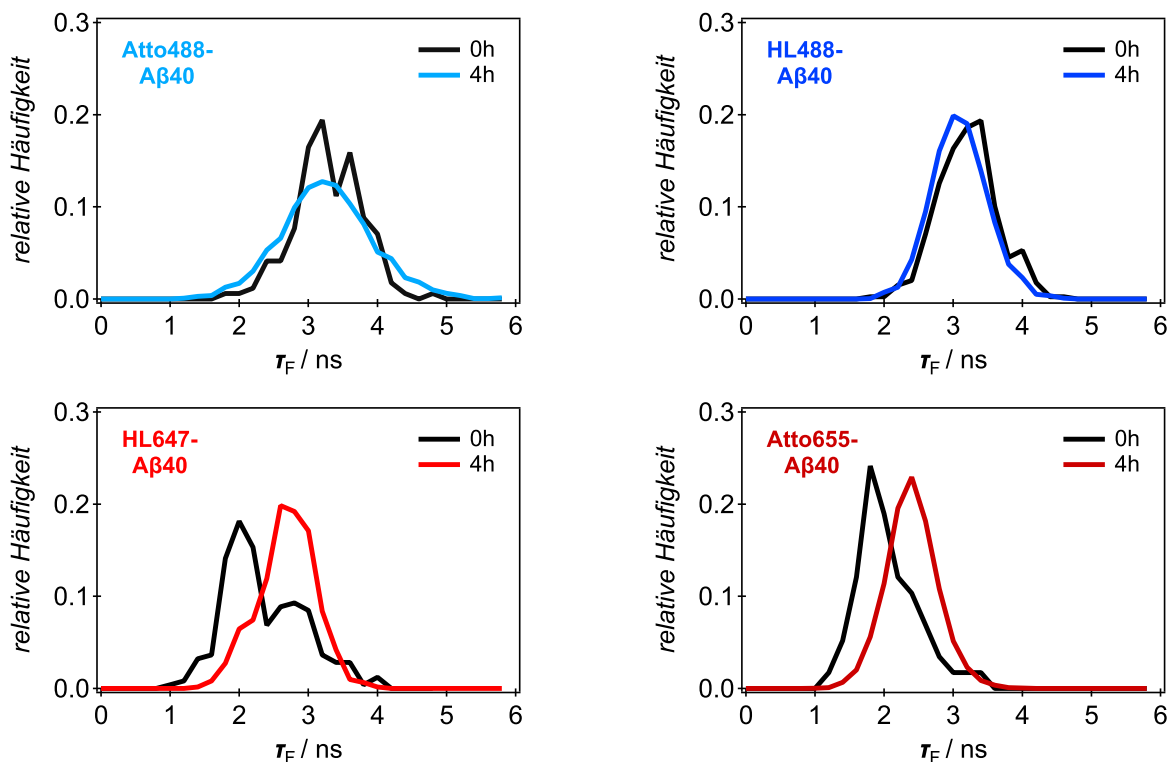


Abbildung 4.6.: Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer durch die Bildung von Oligomeren

Abbildung 4.6 zeigt die Verteilungen der Fluoreszenzlebensdauern zu Beginn der Inkubation, d.h. wenn die Peptide noch als Monomere vorliegen, und nach 4h. Bei Atto488-A $\beta$ 40 und HL488-A $\beta$ 40 kann sowohl nach 0h als auch nach 4h jeweils eine Fluoreszenzlebensdauer von 3.1-3.2 ns beobachtet werden (vgl. Tabelle 4.2). Im Gegensatz dazu verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum sowohl bei HL647-A $\beta$ 40 als auch bei Atto655-A $\beta$ 40: von 2.0 ns auf 2.8 ns für HL647-A $\beta$ 40 und von 1.9 ns auf 2.4 ns für Atto655-A $\beta$ 40.

Peptid	$\tau_f^{mon}$ / ns	$\tau_f^{olig}$ / ns
Atto488-A $\beta$ 40	$3.2 \pm 0.1$	$3.1 \pm 0.1$
HL488-A $\beta$ 40	$3.2 \pm 0.1$	$3.1 \pm 0.1$
HL647-A $\beta$ 40	$2.0 \pm 0.1$	$2.8 \pm 0.1$
Atto655-A $\beta$ 40	$1.9 \pm 0.1$	$2.4 \pm 0.1$

Tabelle 4.2.: **Fluoreszenzlebensdauern gelabelter A $\beta$ -Peptide** Aufgeführt sind die Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_f^{mon}$  nach 0h, d.h. zu Beginn der Aggregation, wenn mit Ausnahme eines gewissen Anteils an HL647-A $\beta$ 40-Peptiden (s. Abb. 4.6 und 4.7) die Peptide noch als Monomere vorliegen, sowie  $\tau_f^{olig}$  nach 4h Inkubation.

Bei HL647-A $\beta$ 40 existiert zu Beginn der Aggregation neben dem Hauptmaximum der Fluoreszenzlebensdauererweiterung noch ein zweites kleineres Maximum bei 2.8 ns. Dieses tritt jedoch erst nach dem Wechsel von pH 9.2 zu pH 7.5 (vgl. Abschnitt 3.1.2) auf; bei pH 9.2 gibt es nur ein Verteilungsmaximum bei 1.9 ns (s. Abb. 4.7). Das spricht dafür, dass sich durch den Wechsel zu pH 7.5 sofort erste Oligomere bilden und das zweite lokale Maximum bei 0 h durch eine sich überlagernde Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern der Oligomere bedingt ist.

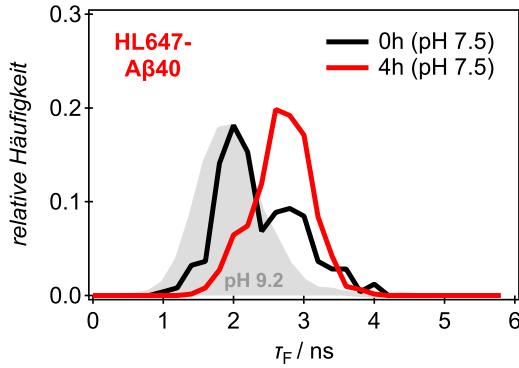


Abbildung 4.7.: **Fluoreszenzlebensdauer von HL647-A $\beta$ 40** Bei pH 9.2 kann nur ein Maximum der Fluoreszenzlebensdauer bei 1.9 ns beobachtet werden. Direkt nach dem Wechsel des pH-Werts (pH 7.5, 0h) erscheint ein zweites Maximum bei 2.4 ns, das erste verschwindet innerhalb von 4 h.

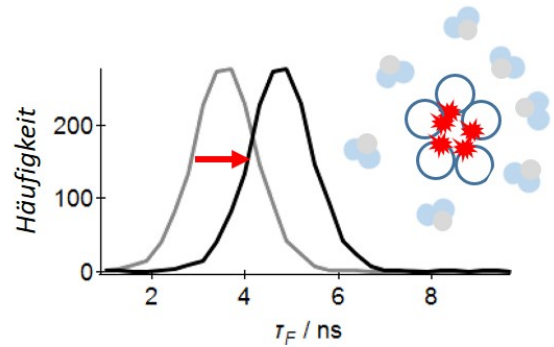


Abbildung 4.8.: **Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer durch hydrophobe Wechselwirkungen** Hydrophobe Wechselwirkungen schirmen die Fluorophore von der polaren wässrigen Lösung ab und führen so zu einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer.

Die Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer kann dadurch erklärt werden, dass Atto655 und HL647 in weniger polaren Umgebungen eine längere Fluoreszenzlebensdauer haben - sie kommt also vermutlich durch eine Abschirmung der hydrophoben Fluorophore von der polaren wässrigen Lösung zustande (vgl. Abb. 4.8). Durch diese hydrophoben Wechselwirkungen induzieren die Fluorophore zusätzliche HMW-Oligomere, die nicht zur Fibrillenbildung beitragen.

### Wechselwirkungen mit dem Peptid

Während die Fluoreszenzlebensdauer Indikator für die Wechselwirkung der Fluorophore mit dem Lösungsmittel war, kann die Analyse des zeitabhängigen Anisotropieabfalls Aufschluss über Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Peptid geben und damit eine mögliche unmittelbare Beeinflussung des Peptids durch den Fluorophor.

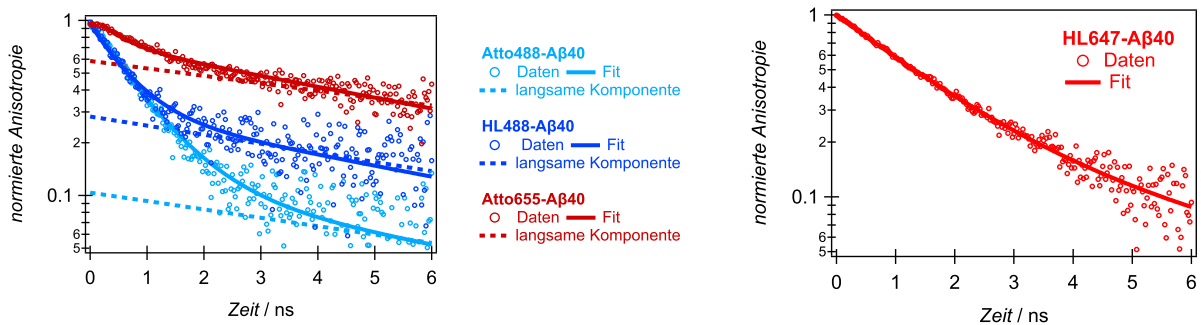


Abbildung 4.9.: **Zeitabhängiger Anisotropieabfall vor Beginn der Fibrillierung** Der Anisotropieabfall von Atto488-A $\beta$ 40, HL488-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 kann durch einen zweifachen exponentiellen Abfall gemäß Glg. 3.14 beschrieben werden (links). Die langsamere Komponente, entsprechend der Rotationsbewegung des Fluorophor-Peptid-Komplexes, ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Im Gegensatz dazu zeigt HL647-A $\beta$  einen einfachen exponentiellen Abfall (rechts).

Abbildung 4.9 zeigt den zeitabhängigen Anisotropieabfall aller vier Peptide samt exponentieller

Funktionsanpassung. Dabei konnten die Anisotropieabfälle von Atto488-A $\beta$ 40, HL488-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 durch einen doppelt-exponentiellen Abfall entsprechend Gleichung 3.14 beschrieben werden, wohingegen HL647-A $\beta$  einen einfachen exponentiellen Abfall zeigt. Für die ersten drei indiziert eine gestrichelte Linie in der Abbildung die langsamere Komponente, die sich aus einer gemeinsamen Rotationsbewegung von Fluorophor und Peptid ergibt. Der Schnittpunkt dieser gestrichelten Linie mit der y-Achse entspricht dem prozentualen Anteil der Fluorophore, die ein solches verlangsamtes Abklingverhalten zeigen. Bereits aus der Abbildung wird ersichtlich, dass Atto488-A $\beta$ 40 den geringsten Anteil an langsam mitsamt dem Peptid rotierenden Fluorophoren hat, Atto655-A $\beta$ 40 hingegen den höchsten. Die genauen Parameter der Rotationsbewegungen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Peptid	$S^2$	$\tau_R^f$ / ns	$\tau_R^{f+p}$ / ns	$D_{\perp}$ / ns $^{-1}$
Atto488-A $\beta$ 40	$0.12 \pm 0.01$	$0.51 \pm 0.02$	$7.00 \pm 0.18$	$0.288 \pm 0.005$
HL488-A $\beta$ 40	$0.28 \pm 0.01$	$0.68 \pm 0.03$	$8.24 \pm 0.03$	$0.168 \pm 0.013$
HL647-A $\beta$ 40	/	$1.77 \pm 0.02$ *	/	$0.094 \pm 0.003$
Atto655-A $\beta$ 40	$0.68 \pm 0.03$	$0.54 \pm 0.09$	$6.08 \pm 0.05$	$0.081 \pm 0.023$

Tabelle 4.3.: **Parameter des Anisotropie-Abfalls gelabelter A $\beta$ -Peptide** Die Parameter wurden gemäß Glg. 3.14, 3.18 und 3.19 bestimmt. \* Dieser Parameter ergibt sich bei HL647-A $\beta$ 40 aus einem einzelnen exponentiellen Abfall. Die Rate der relativen Reorientierung wurde durch  $D_{\perp} = 1/6\tau_R^f$  berechnet.

Bei Atto488-A $\beta$ 40 zeigen 12 % der Peptide einen langsamen Anisotropieabfall mit einer Abklingzeit von  $7.00 \pm 0.18$  ns, die anderen zeigen einen schnelleren Abfall mit einer charakteristischen Zeitkonstante von  $0.51 \pm 0.02$  ns. Die Rate der relativen Reorientierung beträgt  $0.288 \pm 0.005$  ns $^{-1}$ . Bei HL488-A $\beta$ 40 rotiert ein etwas größerer Anteil von 28 % mit der langsameren Abklingzeit des Peptid-Fluorophor-Komplexes von hier  $8.24 \pm 0.18$  ns, während bei den übrigen die Fluorophore frei beweglich sind und die Anisotropie mit  $\tau_R^f=0.68 \pm 0.03$  ns abfällt. Der größere Anteil langsam unter Wechselwirkung mit dem Peptid rotierender Fluorophore korrespondiert mit einer etwas geringeren Rate der relativen Reorientierung von  $0.168 \pm 0.013$  ns $^{-1}$ . Im Gegensatz zu den anderen beiden Peptiden dominiert bei Atto655-A $\beta$ 40 mit 68 % die langsamere Komponente mit einer Abklingzeit von  $6.08 \pm 0.05$  ns den Anisotropieabfall; nur 32 % entfallen auf die schnelle Komponente mit einer Abfallszeit von  $0.54 \pm 0.09$  ns. Dies führt zu einer sehr geringeren Rate der relativen Reorientierung ( $0.081 \pm 0.023$  ns $^{-1}$ ). Die beobachteten langsameren Abklingraten  $\tau_R^{f+p}$  entsprechen einem hydrodynamischen Radius von 1.9-2.1 nm und liegen damit knapp oberhalb des in der Literatur für nicht markiertes A $\beta$ 40 berichteten hydrodynamischen Radius von 1.6-1.7 nm [131, 132].

Betrachtet man die Raten der relativen Reorientierung bzw. den Anteil der langsameren Komponente des Anisotropieabfalls, liegen bei Atto655-A $\beta$ 40 demnach deutlich stärkere Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Peptid vor als für die beiden blauen Farbstoffe. Diese könnten ebenso wie die hydrophobe Abschirmung der Fluorophore vor dem Lösungsmittels durch die stärkere Hydrophobizität von Atto655 bedingt sein.

Einen Sonderfall stellt HL647-A $\beta$ 40 dar, dessen Anisotropieabfall durch eine einzelne Exponentialfunktion mit einer charakteristischen Zeitkonstante von  $1.77 \pm 0.02$  ns beschrieben werden kann. Diese liegt oberhalb der Größenordnung der Zeitkonstante eines frei rotierenden Fluorophors, was dafür spricht, dass es im Fall von HL-A $\beta$ 40 starke Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluorophor gibt. Dies schlägt sich auch in der Rate der relativen Reorientierung von nur  $0.094 \pm 0.003$  ns nieder. Allerdings ist die Abklingzeit auch deutlich geringer als die für einen Peptid-Fluorophor-Komplex beobachteten Zeiten  $\tau_R^{f+p}$ , sodass hier vermutlich ein dynamischer Wechsel zwischen

nicht-kovalenter zusätzlicher Bindung zwischen Peptid und Fluorophor und Lösen der Bindung stattfindet.

### 4.3.3. Schlussfolgerungen für die Eignung als Label

Die bisher dargelegten Analysen zeigen, dass weder HL647 noch Atto655 für die Untersuchung von A $\beta$ 40-Oligomeren eingesetzt werden können, da sie aufgrund ihrer Hydrophobizität und der - vermutlich daraus resultierenden - verstärkten Wechselwirkung zwischen Peptid und Fluorophor die Bildung von größeren Aggregaten induzieren. Eine solche Tendenz wurde für HL647 auch von *Johnsson et al.* erwähnt [19]. Der beste Kandidat für die Charakterisierung von A $\beta$ 40-Oligomeren von den vier untersuchten Fluorophoren ist Atto488, für das wie auch bei HL488-A $\beta$ 40 keine Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet werden kann. Mit nur 12 % in der Größenordnung eines Fluorophor-Peptid-Komplexes rotierenden Peptiden und einer Rate der relativen Reorientierung von ca.  $0.29 \text{ ns}^{-1}$  wird die Rotationsbewegung von Atto488 zudem am wenigsten durch das Peptid behindert, was für geringe Wechselwirkungen zwischen A $\beta$ 40 und Atto488 spricht, sodass die Bildung von Oligomeren wenig oder gar nicht beeinflusst wird. Dies schlägt sich auch in der Morphologie der finalen Fibrillen wieder, die derjenigen des Wildtyps am meisten ähnelt.

Um als Fluorophor für die Untersuchung der Aggregation eines Peptids geeignet zu sein, sollte ein Farbstoff demnach möglichst wenig mit dem Peptid, an das er kovalent gebunden wird, wechselwirken und nicht zur Abschirmung vom verwendeten Lösungsmittel neigen. Da dies nicht nur vom Fluorophor abhängt, mögen diese Kriterien bei anderen Peptiden oder Lösungsmitteln von anderen Fluorophoren erfüllt werden als im hier untersuchten Fall von A $\beta$ 40 in einer wässrigen Natriumphosphatpufferlösung.

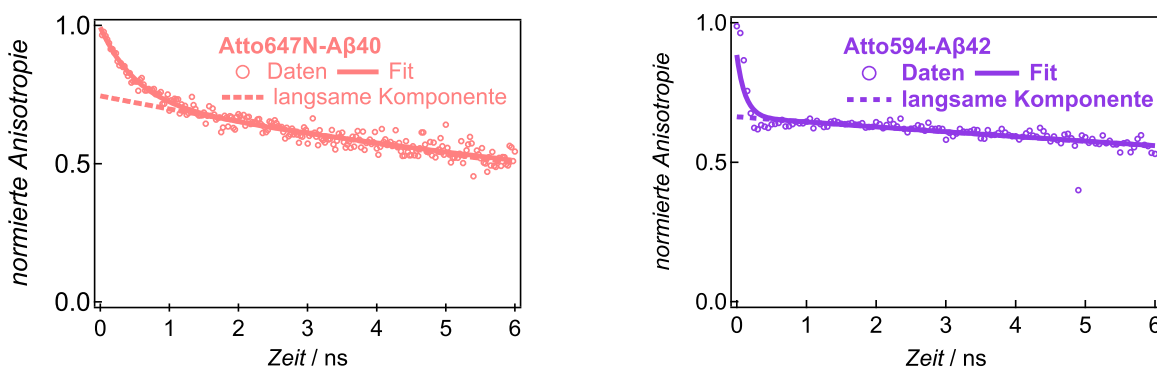


Abbildung 4.10.: **Anisotropiemessungen als Ausschlusskriterium für Fluorophore** Im Fall von Atto647N-A $\beta$ 40 zeigen 74 % der Peptide den langsameren Anisotropieabfall, bei Atto594-A $\beta$ 42 sogar 78 %. Beide wurden nach dem *pH9-Protokoll* gelöst und direkt nach Wechsel zu pH 7.4 vermessen. Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt  $40 \mu\text{M}$  für Atto647N-A $\beta$ 40 und  $10 \mu\text{M}$  für Atto594-A $\beta$ 42.

Als erster Indikator für die Eignung eines Fluorophors zur Untersuchung eines Aggregationsprozesses kann die Messung des Anisotropieabfalls dienen. Abbildung 4.10 zeigt zwei Beispiele von Peptid-Fluorophorkombinationen, bei denen bereits die Messung der Anisotropie eine mangelnde Eignung für diesen Zweck nahelegt: Atto647N-A $\beta$ 40 hat mit  $\sim 0.039 \text{ ns}^{-1}$  sogar eine noch geringere Rate der relativen Reorientierung als Atto655-A $\beta$ 40; 74 % der Fluorophore rotieren im Verbund mit dem Peptid. Bei Atto594-A $\beta$ 42 gilt dies sogar für 78 % der Peptide. Dass die langsamere Abklingzeit etwa  $42.3 \text{ ns}$  beträgt, einem hydrodynamischen Radius von ca.  $3.6 \text{ nm}$  entsprechend, weist zudem daraufhin, dass bereits ohne Inkubation Aggregate bei pH 7.4 existieren, mit deren Komplex die Atto594-Fluorophore rotieren. Dieser Befund wird dadurch gestützt, dass auch eine schlechte Löslichkeit von Atto594-A $\beta$ 42 beobachtet wurde.

#### 4.4. Vergleich mit A $\beta$ 42

Um die Größenverteilung von A $\beta$ 40-Oligomeren mit derjenigen von A $\beta$ 42 vergleichen zu können, wurde der für A $\beta$ 40 am besten geeignete Fluorophor Atto488 auch als Markierung von A $\beta$ 42 getestet. Dafür wurde die Konzentration der Inkubationslösung auf 10  $\mu$ M reduziert, um trotz der schnelleren Aggregation des A $\beta$ 42-Peptids ein Zeitfenster zu erhalten, in dem ein metastabiles Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren herrscht. Abbildung 4.11 zeigt einen Vergleich der unter identischen Bedingungen aufgenommenen ThT Assays von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42. Auf ihrer Grundlage wurden für A $\beta$ 40 wiederum 4 h als Zeitfenster für die Analyse der Größenverteilung der Oligomere ausgewählt, für A $\beta$ 42 hingegen 2 h, um beide Peptide am Ende der - in Gegenwart des potentiell die Aggregation beschleunigenden ThT [102] - beobachteten Lagphase zu untersuchen. Allerdings unterschied sich die Größenverteilung von A $\beta$ 42-Oligomeren nach 4 h nicht signifikant von derjenigen nach 2 h (vgl. Abb. A.3 in Anhang A.3), sodass auch ein solcher Vergleich der beiden Peptide möglich gewesen wäre. Dies zeigt auch, dass wie gewünscht ein Zeitpunkt metastabilen Gleichgewichts ausgewählt wurde.

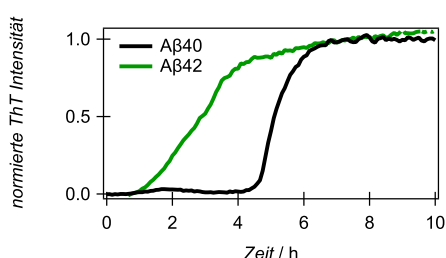


Abbildung 4.11.: **Vergleich der Lagzeiten von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42** Die Peptidkonzentration der Lösungen betrug 10  $\mu$ M.

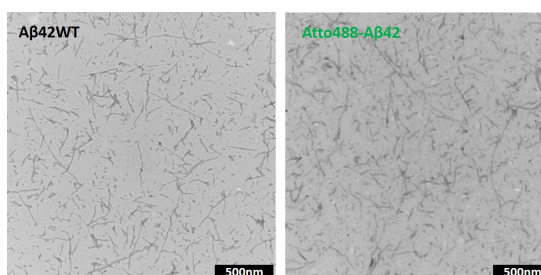


Abbildung 4.12.: **Morphologie der A $\beta$ 42-Fibrillen** Die TEM-Abbildungen wurden nach 24h aufgenommen, der DOL bei Atto488-A $\beta$ 42 betrug 2 %.

Atto488 erwies sich auch als passender Fluorophor für A $\beta$ 42: Er beeinflusste weder die Morphologie der Fibrillen noch zeigte er starke Wechselwirkungen mit dem Peptid oder hydrophobes Verhalten gegenüber der wässrigen Lösung, wobei letzteres aufgrund der bisherigen Ergebnisse auch nicht zu erwarten war. Nach 24h Inkubation zeigen der Wildtyp von A $\beta$ 42 ebenso mit niedrigem oder hohem Prozentsatz markierte Atto488-A $\beta$ 42-Lösungen längliche, wenig gebogene Fibrillen, die allerdings deutlich kürzer sind als die von A $\beta$ 40 gebildeten (vgl. Abb. 4.12).

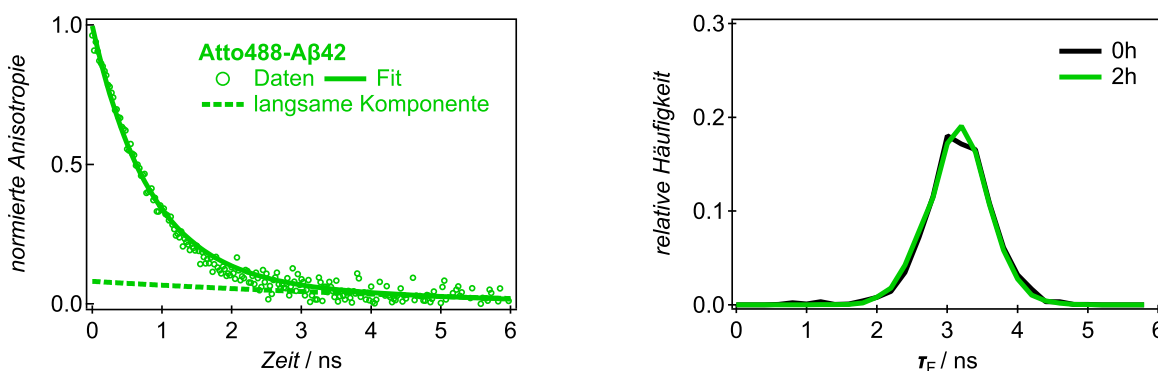


Abbildung 4.13.: **Eignung von Atto488 als Markierung von A $\beta$ 42** Nur etwa 14% der Atto488-A $\beta$ 42-Peptide zeigen den langsameren Fluoreszenzabfall mit einer Abklingzeit von ca. 7.7 ns. Dies korrespondiert mit einer hohen Rate der relativen Reorientierung von  $\sim 0.17 \text{ ns}^{-1}$ . Der Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern zu Beginn der Aggregation und nach 2h zeigt in beiden Fällen eine Verteilung um 3.2 ns.

Abbildung 4.13 zeigt sowohl den beobachteten Anisotropieabfall (links) als auch den Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern nach 0h und 2h (rechts). Nur 14% der Peptide zeigten den langsameren Anisotropieabfall von 7.7 ns, der einer gemeinsamen Rotation von Fluorophor und Peptide



entspricht. Dementsprechend hoch ist die Rate der relativen Reorientierung von  $0.17\text{ns}^{-1}$ . Dies spricht für eine geringe Wechselwirkung zwischen Peptid und Fluorophor. Es wurde außerdem keine Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer von  $3.2\text{ns}$  nach  $2\text{h}$  Inkubation beobachtet, d.h. wie bei Atto488-A $\beta$ 40 bleibt der Fluorophor auch hier trotz Oligomerbildung gleichermaßen im Kontakt mit dem Lösungsmittel.

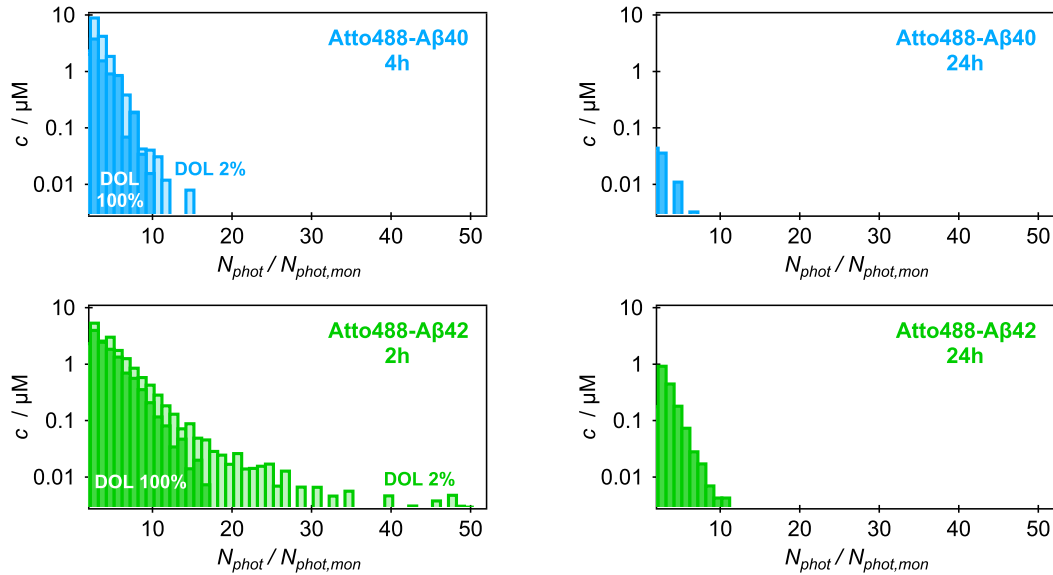


Abbildung 4.14.: **Vergleich der Größenverteilungen der Oligomere von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42** Die gezeigten Größenverteilungen wurden innerhalb der Lagphase (vgl. Abb. 4.11) und nach Abschluss der Aggregation (nach  $24\text{h}$ ) bei  $10\text{ }\mu\text{M}$  und einem DOL nahe  $100\%$  aufgenommen. Um mit höherer Wahrscheinlichkeit Oligomere zu beobachten, wurden nach  $2\text{h}$  bzw.  $4\text{h}$  zudem Messungen mit einem DOL von  $2\%$  durchgeführt.

Abbildung 4.14 stellt die Größenverteilungen der Oligomere nach  $2\text{h}$  bzw.  $4\text{h}$  und nach  $24\text{h}$  jeweils mit einem DOL von  $100\%$  dar. Für den jeweils erstenen Zeitpunkt werden zudem Messungen mit einem geringeren DOL von  $2\%$  gezeigt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, große Oligomere zu beobachten. Bereits bei einem DOL von  $100\%$  können für Atto488-A $\beta$ 42 HMW-Oligomere und eine breitere Oligomerverteilung nach  $2\text{h}$  beobachtet werden: Die Verteilung besitzt einen Mittelwert von  $3.5 N_{\text{phot},\text{mon}}$  bei einer Breite von  $4.4 N_{\text{phot},\text{mon}}$ . Demgegenüber hat die Verteilung von Atto488-A $\beta$ 40 nur einen Mittelwert von  $2.6 N_{\text{phot},\text{mon}}$  bei einer Breite von  $2.8 N_{\text{phot},\text{mon}}$ . Dieser Eindruck verstärkt sich noch bei Betrachtung der Verteilungen mit einem DOL von  $2\%$ : Während für Atto488-A $\beta$ 40 kaum mehr HMW-Oligomere sichtbar werden und die Verteilung mit einem Mittelwert von  $2.9 N_{\text{phot},\text{mon}}$  und einer Breite von  $3.3 N_{\text{phot},\text{mon}}$  sehr ähnlich bleibt, wachsen im Fall von Atto488-A $\beta$ 42 Mittelwert und Breite an auf  $4.5 N_{\text{phot},\text{mon}}$  bzw.  $6.5 N_{\text{phot},\text{mon}}$ . Die hier genannten charakteristischen Größen der Verteilung sind auch in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Nach  $24\text{h}$  können für beide Peptide keine HMW-Oligomere mehr beobachtet werden. Diese Tatsache und dass keine Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet wurde, zeigt, dass es sich bei den hier beobachteten HMW-Oligomeren um *on-pathway*-Oligomere handelt, die als Bestandteil des Peptidaggregationspfades gebildet und nicht durch Wechselwirkungen des Fluorophors induziert wurden. Allerdings ist für Atto488-A $\beta$ 42 nach  $24\text{h}$  noch ein geringer Anteil kleinerer Oligomere vorhanden, sodass die Fibrillierung unter den hier gewählten Inkubationsbedingungen schneller und vermittelt größerer Oligomere verläuft, aber nicht so effizient wie bei Atto488-A $\beta$ 40. Dass sich die Aggregationspfade von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 hinsichtlich der Größe der beobachteten Oligomere unterscheiden - wobei A $\beta$ 42 die größeren Oligomere bildet - passt auch zu anderen experimentellen Ergebnissen aus der Literatur (vgl. bspw. [120]).

Peptid	DOL 100 %		DOL 2 %	
	$\mu_1$	$\mu_2^{1/2}$	$\mu_1$	$\mu_2^{1/2}$
Atto488-A $\beta$ 40	$2.6 \pm 0.1$	$2.8 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.1$	$3.3 \pm 0.1$
Atto488-A $\beta$ 42	$3.5 \pm 0.2$	$4.4 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.1$	$6.5 \pm 0.5$

Tabelle 4.4.: **Größenverteilungen der Oligomere von A $\beta$ 40 nach 4 h und A $\beta$ 42 nach 2 h**  $\mu_1$  gibt den Mittelwert der Verteilung an,  $\mu_s^{1/2}$  ist ein Maße für Breite. Sie wurden gemäß den Gleichungen 3.34 und 3.35 berechnet.

## 4.5. Zusammenfassung

Die markierten Peptide Atto488-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 sowie HL488-A $\beta$ 40 und HL647-A $\beta$ 40 wurden mittels smFS-Messungen und ergänzenden TEM- und AFM-Aufnahmen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bildung von Oligomeren untersucht. Dabei zeigte sich, dass die beiden roten Fluorophore Atto655 und HL647 die Bildung von HMW-Oligomeren induzieren, die nicht Bestandteil des Aggregationspfades des A $\beta$ 40-Peptids sind und auch nach Abschluss der Fibrillierung in Lösung bleiben. Diese Eigenschaft kann auf ihre im Vergleich zu HL488 und Atto488 erhöhte Hydrophobizität zurückgeführt werden, die sich durch eine Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer durch die Abschirmung vom wässrigen Lösungsmittel ausdrückt und eine verstärkte Wechselwirkung mit dem Peptid. Letztere kann über Messungen des Abfalls der Fluoreszenzanisotropie und die Berechnung der relativen Rate der Reorientierung indirekt quantifiziert werden. Die zeitabhängige Messung der Anisotropie eignet sich daher als erster Indikator für die Eignung eines Fluorophors zur Untersuchung der Oligomerisierung. Mit ihr konnte gezeigt werden, dass auch die hier nicht ausführlich getesteten Fluorophore Atto647N und Atto594 nicht als Markierung von A $\beta$ -Peptiden geeignet sind. Als bester Kandidat aller untersuchten Fluorophore erwies sich Atto488, das als Markierung von A $\beta$ 40 eine Rate der relativen Reorientierung von ca.  $0.29 \text{ ns}^{-1}$  hatte, und für das A $\beta$ 40 die geringste Verteilungsbreite von  $2.7 N_{\text{phot,mon}}$  aufwies. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstützen auf Ebene der Oligomere damit die eingangs genannten Beispiele aus der Literatur [128, 129, 70], die davon ausgehen, dass auch eine Markierung am vermeintlich nur eine untergeordnete Rolle spielenden N-Terminus einen Einfluss auf den Aggregationsprozess hat. Auch die Morphologie der finalen Fibrillen wurde durch die hydrophoben Farbstoffe beeinflusst: Es bildeten sich im Vergleich zum Wildtyp dünnere und stärker gebogene Fibrillen.

Ein Vergleich zwischen Atto488-A $\beta$ 40 und Atto488-A $\beta$ 42 zeigt, dass A $\beta$ 42 während des Aggregationsprozesses in größerer Zahl HMW-Oligomere bildet, die aufgrund ihres Verschwindens nach 24 h und ihrer fehlenden Auswirkung auf die Fluoreszenzlebensdauer deutlich von den Fluorophor-induzierten Oligomeren unterscheidbar sind, die bei HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 auftreten. A $\beta$ 40 formt bei Markierung mit einem geeigneten Fluorophor hingegen wenige bis gar keine HMW-Oligomere. Dies bestätigt die bereits in der Literatur prognostizierten unterschiedlichen Aggregationspfade von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42.

# 5. Aggregationskinetiken und -mechanismen des Amyloid- $\beta$ -Peptids

## 5.1. Einleitung und Fragestellung

Die Fibrillenbildung des A $\beta$ -Peptids und die Herausbildung neurotoxischer Oligomere, die eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Alzheimer spielen, sind nach derzeitigem Kenntnisstand eng miteinander verknüpft [9]. Erstere lässt sich als Keimbildungsprozess mit anschließendem Wachstum durch Monomeraddition beschreiben (s. Kap. 2.2.3); die Kinetik der Umwandlung von als Monomeren gelösten A $\beta$ -Peptiden in geordnete Strukturen kann makroskopisch mittels ThT Assays verfolgt werden [22, 95]. Mathematische Modelle, die für diese Prozesse, die zur Fibrillenbildung beisteuern, entwickelt wurden, können die beobachteten Kinetiken mit ihnen zugrunde liegenden mikroskopischen Prozessen verknüpfen (vgl. bspw. [56]).

Die Anwendung der von *Knowles und Dobson* entwickelten umfangreichen Keimbildungsmodelle auf die Aggregation von rekombinanten A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 ergab in beiden Fällen eine Reaktionsordnung von zwei sowohl für die primäre als auch die sekundäre Keimbildungsreaktion; sie gehen also von Dimeren als kritischen Keimen der Aggregation aus [54, 55]. Dimere gelten auch als kleinstes toxisches Oligomer des A $\beta$ -Peptids und möglicher Grundbaustein toxischer Aggregate [133, 134]. Ein nur für A $\beta$ 40 beobachtetes Sättigungsverhalten der Sekundärkeimbildung bei hohen initialen Monomerkonzentrationen wurde dabei als wesentliches Unterscheidungsmerkmal der beiden Aggregationsprozesse gesehen [55]. Aus der Analyse desselben Datensatzes durch das Modell von *Dovidchenko et al.* [62] resultierte jedoch davon abweichend ein Monomer als Sekundärkeim der A $\beta$ 40-Aggregation und ein Trimer als Primärkeim der A $\beta$ 42-Aggregation [63]. Auch für das Sättigungsverhalten des A $\beta$ 40-Peptids bei hohen Konzentrationen wurden alternative Interpretationen unterbreitet: *Ferrone* erklärte es durch einen Aggregationsprozess, bei dem nicht etwa die Dimerbildung, sondern eine Konformationsänderung des Monomers die Aggregation startet [59]. *Finkelstein et al.* zeigten schließlich, dass auch die parallele Generation von *Off-Pathway*-Oligomeren mit vier bis sechs Monomeren zu dem beobachteten Sättigungsverhalten führen könnte [57]. Die Möglichkeit der Oligomerbildung wurde von den Gruppen *Knowles*, *Linse* und *Dobson* erst kürzlich in die Keimbildungsmodelle integriert [27, 26], eine entsprechende Datenanalyse aber bislang nur für A $\beta$ 42 vorgelegt.<sup>1</sup>

Auch für A $\beta$ 40 wurde jedoch eine Aggregation mittels Oligomeren postuliert, möglicherweise mit einem konzentrationsabhängigen Übergang von *One-Step*- zu *Two-Step-Nucleation* [53]. Daher sollen in diesem Kapitel die folgenden Fragen adressiert werden: Welche Kenngrößen des Keimbildungsprozesses erhält man bei Verwendung der aktuellsten Aggregationsmodelle von *Knowles*, *Linse* und *Dobson* [27, 26]? Gibt es experimentelle Hinweise, dass die durch das hier *a priori* verwendete Modell erschlossenen Keimgrößen tatsächlich stimmen? Und genügen die aktuellen Modelle, um die über einen Konzentrationsbereich zwischen 2  $\mu$ M bis 160  $\mu$ M im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen A $\beta$ 40-Kinetiken zu beschreiben oder werden ggf. Ergänzungen benötigt?

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass möglicherweise die Konformationsänderung eines Monomers hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt-begünstigenden Struktur Startpunkt der Aggregation sein könnte, ist auch der Vergleich mit anderen A $\beta$ 40-Varianten interessant: Wie verändert sich die Aggregationskinetik bei Verwendung von Varianten, bei denen eine Aminosäure durch Prolin ersetzt wurde? Prolin befindet sich in nativen Proteinen vorwiegend in ungeordneten Strukturen und in Schleifen, wohingegen es destabilisierend auf  $\alpha$ -Helixen und  $\beta$ -Faltblattstrukturen wirkt [135]. Aus diesem Grund wird eine gezielte Prolin-Mutagenese an mehreren Stellen eines Peptids auch für die Strukturaufklärung genutzt (s. bspw. [136, 137]). Für diese Arbeit wurden die potentiell die Fibrillierung

<sup>1</sup> *Dear et al.* [26] präsentieren zwar auch eine Abbildung zu A $\beta$ 40, geben aber nur die involvierten mikroskopischen Prozesse und Kenngrößen der Keimbildung für A $\beta$ 42 an.

begünstigende Variante E22P und die potentiell inhibierende Variante G37P vergleichend zum Wildtyp des A $\beta$ 40-Peptids untersucht: Wie genau wirkt sich diese Begünstigung bzw. Inhibition auf die Kinetik und die modellhaft angenommenen dahinter stehenden mikroskopischen Prozesse aus? Welche möglichen Pfade der A $\beta$ 40-Fibrillierung ergeben sich bei Zusammenstellung all dieser Einzeluntersuchungen?

Nach Abschluss der Untersuchung des A $\beta$ 40-Peptids sollen die erhaltenen Daten abschließend mit dem Verhalten von A $\beta$ 42 und seiner Varianten E22P und G37P verglichen werden: Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten lassen sich hier feststellen?

Um die hier aufgeworfenen Fragen zu beantworten, wurden zunächst die Aggregationsbedingungen so optimiert, dass ein Modellsystem angenommen werden kann (s. Kap. 5.2), in dem hauptsächlich primäre Keimbildungsprozesse in Lösung und sekundäre Keimbildung an Fibrillenoberflächen stattfinden, andere Sekundärprozesse hingegen vernachlässigt werden können. Unter diesen Bedingungen wird dann das Aggregationsverhalten von A $\beta$ 40WT auf Grundlage von ThT Assays und ergänzenden smFS-Daten unter Rückgriff auf die Modelle von *Knowles, Linse* und *Dobson* [26, 27, 56] sowie *Dovidchenko et al.* [62] diskutiert (s. Kap. 5.3). Die für den Wildtyp aufgezeichneten Kinetiken werden anschließend zunächst mit den beiden Varianten A $\beta$ 40E22P und A $\beta$ 40G37P verglichen (s. Kap. 5.4) und bestehende Modelle ggf. erweitert (s. Kap. 5.5). Alle Resultate werden dann zu einem Gesamtbild der möglichen Aggregationspfade des A $\beta$ 40-Peptids zusammengeführt (s. Kap. 5.6). Abrundend folgt zum Schluss ein Vergleich mit A $\beta$ 42WT und den entsprechenden Varianten A $\beta$ 42E22P und A $\beta$ 42G37P (s. Kap. 5.7).

## 5.2. Optimierung der Aggregationsbedingungen

Die Aggregation des A $\beta$ -Peptids hängt in hohem Maße von äußeren Bedingungen wie Temperatur oder pH-Wert ab [138, 139]. Aber auch präparative Entscheidungen wie die Wahl des Protokolls zur Peptidsynthese können die Fibrillierungskinetik beeinflussen [69]. Als Ausgangspunkt für die nachfolgende Untersuchung der Aggregation des A $\beta$ 40-Peptids und seiner Auswertung mit unterschiedlichen Modellen sowie des Vergleichs mit A $\beta$ 42 soll ein möglichst einfaches Modellsystem gefunden werden, das im Idealfall allein Primär- und Sekundärkeimbildungsprozesse enthält, nicht aber Fragmentierung oder Formen der heterogenen Keimbildung, z.B. an Oberflächen. Dazu war zunächst eine Optimierung der Präparations- und Inkubationsprotokolle notwendig. Sofern nicht anders angegeben, wurde dabei stets mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M gearbeitet und bei pH 7.4 und 37 ° in Gegenwart von 150 mM NaCl und 20  $\mu$ M ThT inkubiert.

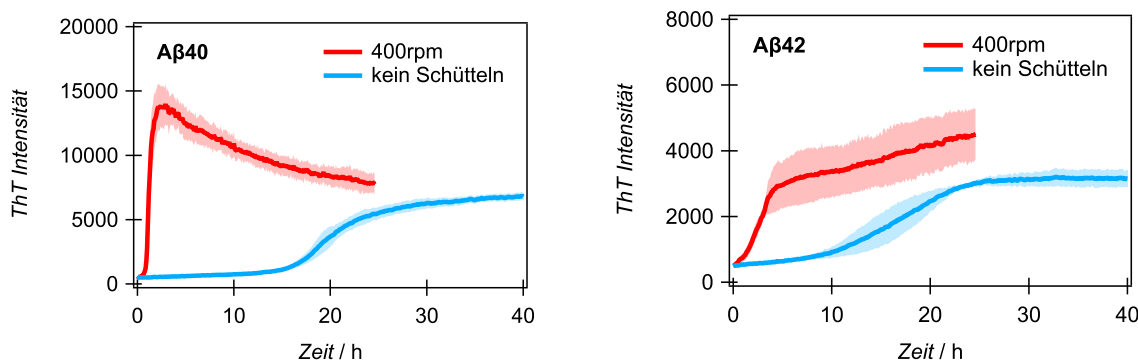


Abbildung 5.1.: **Einfluss des Schüttelns auf die Aggregationskinetik** ThT Assays an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 jeweils mit orbitalem Schütteln mit 400rpm und ohne Schütteln. Gezeigt werden über 3 Messungen gemittelte Assays inkl. Standardabweichung (hell schattiert). Für alle Messungen wurden die Proben gemäß dem *pH9-Protokoll* bei pH 9.2 gelöst.

Abbildung 5.1 zeigt, dass ein Verzicht auf das Schütteln, das zum in Kapitel 4 verwendeten Inkubationsprotokoll gehört, bei beiden Peptiden zu einer deutlich verlangsamten Aggregationskinetik

führt und zu einer geringeren ThT Intensität in der Plateauphase. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass durch das Weglassen des Schüttelns Fragmentationsprozesse reduziert werden. Diese können zur Aggregation beitragen, da sie neue Fibrillenenden und damit Reaktionsflächen für die Monomeraddition produzieren, und werden durch das Schütteln aggregierender A $\beta$ -Lösungen induziert - umso mehr, je höher die Drehzahl des orbitalen Schüttelns gewählt wird; durch ein Verzicht auf Schütteln während der Inkubation werden sie hingegen auf ein vernachlässigbares Maß reduziert [54].

Neben Fragmentationseffekten sollen auch Aggregationseffekte durch preaggregierte Lösungen minimiert und im Idealfall ganz ausgeschlossen werden. Es werden daher Aggregationslösungen angestrebt, in denen die A $\beta$ -Peptide bis zum Beginn der Messungen möglichst ausschließlich als Monomere vorliegen. Deshalb werden Startbedingungen benötigt, bei denen sich die Peptide auch in deutlich übersättigten Lösungen mit sehr hoher initialer Monomerkonzentration vollständig lösen, da der Rückschluss auf mikroskopische Prozessgrößen für alle hier diskutierten Modelle nur durch Aufnahme einer Konzentrationsserie möglich ist.

Bei dem in Kapitel 4 verwendeten *pH9-Protokoll* liegen bei einer Konzentration von 200  $\mu$ M und pH9.2 bereits vor dem Start der Inkubation Aggregate vor (vgl. Abb. 5.2). Selbst im Fall nicht-fibrillärer Aggregate könnten sie die Aggregationskinetik beeinflussen, indem sie die effektiv zur Verfügung stehende Konzentration freier Monomere senken und heterogene Keimbildung an ihren Oberflächen ermöglichen. Während ersteres die Aggregation verlangsamt, würde sich letzteres in einer Beschleunigung der Aggregation im Vergleich zu einer rein monomeren Startlösung äußern.

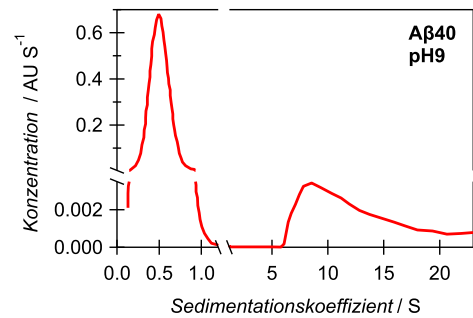


Abbildung 5.2.: **Vorhandensein von Aggregation in A $\beta$ 40-Lösungen bei pH 9** Analytische Ultrazentrifugation mit 40000 rpm an 200  $\mu$ M A $\beta$ 40. Der apparente Sedimentationskoeffizient des Hauptsignals von 0.49 S entspricht dabei dem Molekulargewicht von A $\beta$ 40-Monomeren. Ein weiteres, von heterogenen Aggregaten zeugendes Signal liegt im Bereich von etwa 5-20 S. Diese Aggregate machen etwa 10 % des enthaltenen A $\beta$ 40 aus.

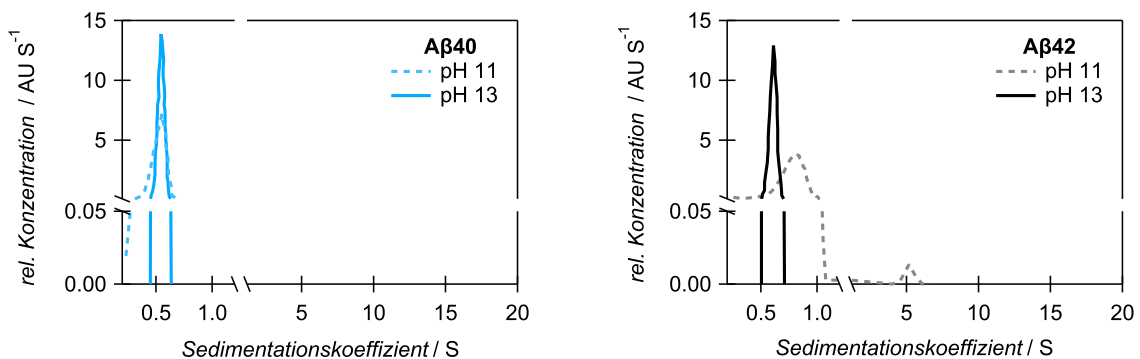


Abbildung 5.3.: **Erzeugung aggregatfreier A $\beta$ -Lösungen mittels Erhöhung des pH-Werts** Analytische Ultrazentrifugation mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 40000 rpm an A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Lösungen mit einer Konzentration von je 200  $\mu$ M. Einzig für A $\beta$ 42 bei pH 11 sind noch Aggregate in geringer Konzentration beobachtbar; in allen anderen drei Fällen entstehen rein monomere Lösungen.

Zur Präparation rein monomerischer A $\beta$ -Lösungen werden häufig organische Lösungsmittel oder Filtrationsprozesse wie die Gel-Permeations-Chromatographie verwendet (s. bspw. [54]). Hier wurde jedoch ein anderer Ansatz gewählt: Da bekannt ist, dass ein niedriger pH-Wert die Aggregation des A $\beta$ -Peptids extrem beschleunigen kann [140], soll die Bildung von Aggregaten durch die Wahl eines ausreichend hohen pH-Werts unterdrückt werden. Da sich diese pH-Werte mit Natriumphosphatpuf-

fer nicht erreichen lassen, wurden die A $\beta$ -Peptide stattdessen in wässriger Natriumhydroxidlösung mit einem pH-Wert von 11 bzw. 12.8 gelöst. Die Auswirkung eines veränderten pH-Werts auf die bei AUZ-Messungen sichtbare Größenverteilung ist in Abb. 5.3 dargestellt: Bei A $\beta$ 40 genügt es bereits, den pH-Wert der Präparationslösung auf pH 11 zu erhöhen, damit nur noch Monomere vorliegen. A $\beta$ 42-Lösungen enthalten selbst bei pH 11 noch einen sehr geringen Anteil größerer Aggregate mit einem apparenten Sedimentationskoeffizient von ca. 5 S. Das im Vergleich zu A $\beta$ 40 verbreiterte und zu einem etwas höheren apparenten Sedimentationskoeffizienten verschobene Signal könnte außerdem auf das zusätzliche Vorhandensein von Dimeren hindeuten. Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Werts auf einen pH-Wert von pH 12.8 sind dann beide Lösungen frei von Aggregaten.

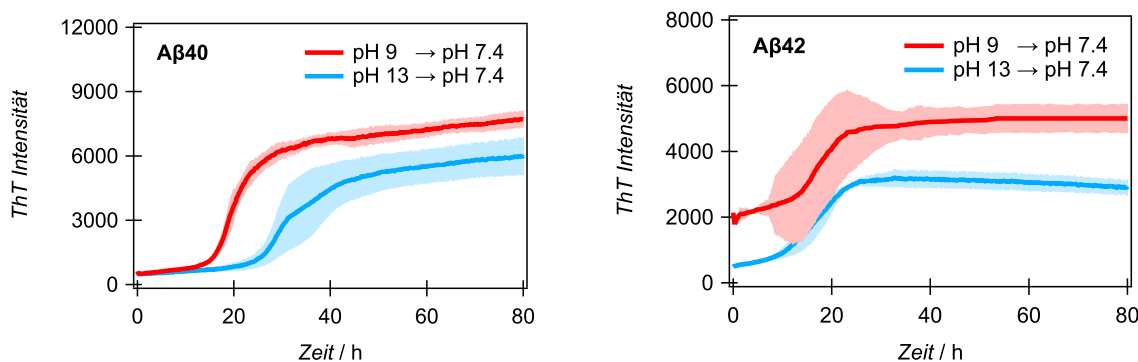


Abbildung 5.4.: **Einfluss des pH-Werts im Präparationsprotokoll auf die Aggregationskinetik** ThT Assays an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 jeweils gelöst nach dem *pH9-Protokoll* bei pH 9.2 und entsprechend dem *pH13-Protokoll* bei pH 12.8. Gezeigt werden über mehrere Messungen gemittelte Assays inkl. Standardabweichung (hell schattiert). Für alle Messungen wurden die Proben nach Lösen des A $\beta$ s bei dem angegebenen pH-Wert ohne Schütteln inkubiert.

Die Präparationsprotokolle haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Aggregationskinetik: Werden A $\beta$ -Peptide in 60 mM NaOH gelöst und anschließend mit 150 mM NaCl bei pH 7.4 und 37 °C inkubiert (*pH13-Protokoll*, für Details s. auch 3.1.2), verringert sich bei Aufnahme von ThT Assays die Plateauhöhe und die Lagzeit verlängert sich (s. Abb. 5.4). Das spricht dafür, dass hier Keimbildungsprozesse unterdrückt werden, die durch die beim *pH9-Protokoll* zu Beginn existierenden Aggregate ermöglicht werden. Auffällig ist zudem, dass die Intensität der ThT Fluoreszenz zu Beginn der Lagphase bei pH 9.2 für A $\beta$ 42 bei ca. 2000 cts liegt, also dem 4-fachen der gemessenen Eigenfluoreszenz von ThT. Der Abfall des Lagphasen-Plateaus auf den erwarteten Fluoreszenzuntergrund von ca. 500 cts bei einem Wechsel zum *pH13-Protokoll* unterstreicht nochmals den Übergang zu rein monomeren Ausgangslösungen durch das veränderte Protokoll. Interessanterweise bleibt jedoch - im Gegensatz zu A $\beta$ 40 - die Intensitätsdifferenz zwischen Lag- und Plateauphase unverändert: Ggf. tragen die Aggregate, die zu dem erhöhten Anfangswert der ThT Intensität führen, demnach gar nicht zu Aggregation bei.

Die veränderten Start- und Inkubationsbedingungen der Fibrillierung und die damit einhergehende Reduzierung von Fragmentation und heterogenen Keimbildungseffekten führen auch zu anderen Größenverteilungen der beobachteten Oligomere: Konnte für A $\beta$ 42 bei Verwendung des *pH9-Protokolls* noch das Auftreten größerer HMW-Oligomere im Verlauf der Aggregation beobachtet werden ([71], vgl. auch Kap. 4), treten diese bei Verwendung des neuen Protokolls nicht mehr auf: smFS-Messungen zeigen kaum Veränderungen der beobachteten Spezies über den gesamten Aggregationsverlauf, wie in Abb. 5.5 für drei beispielhafte Zeitpunkte, die jeweils Lag-, Wachstums- und Plateauphase repräsentieren, zeigt.

Als weiterer Aggregationspfad neben Primärkeimbildung in der Lösung und Sekundärkeimbildung an Fibrillenoberflächen, sind auch heterogene Keimbildungsprozesse an nicht-fibrillären Oberflächen denkbar, die z.B. an den Wänden der Reaktionsgefäße - in diesem Fall den Mikrotiterplatten, in denen die ThT Assays ablaufen - vorhanden sind. An diesen Oberflächen könnten

sich andererseits auch Monomere oder Aggregate anlagern und so der Aggregation entzogen werden. Beide Prozesse müssten in einem mikroskopischen Modell berücksichtigt werden, um den Aggregationsverlauf angemessen zu beschreiben. Um den Einfluss der Oberfläche der Mikrotiterplatten zu reduzieren, wurden *non-binding* Mikrotiterplatten (s. auch Kap. 3.4.2) eingesetzt.

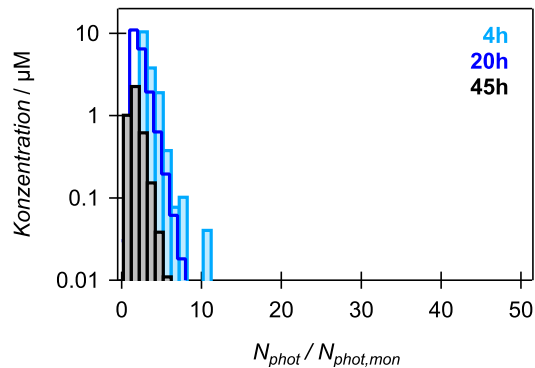


Abbildung 5.5.: **Größenverteilung von A $\beta$ 42-Oligomeren im Aggregationsverlauf bei Benutzung des pH13-Protokolls** Aus smFS-Messungen gewonnene Daten einer bei 37°C ohne Schütteln aggregierenden 40  $\mu$ M A $\beta$ -Lösung mit 150 mM NaCl. Hier repräsentativ zu sehen sind je eine Messung während der Lagphase (4h), der Wachstumsphase (20h) und der Plateauphase (45h).

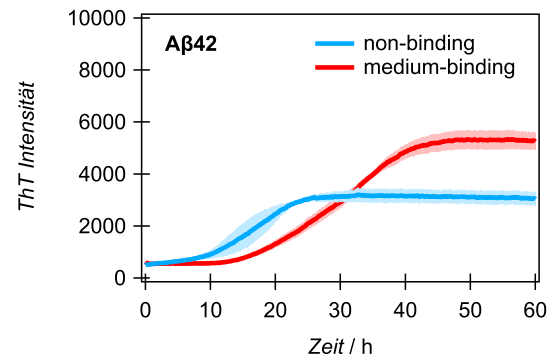


Abbildung 5.6.: **Einfluss der verwendeten Mikrotiterplatte auf die Aggregationskinetik ThT Assays an A $\beta$ 42**, das entsprechend dem pH13-Protokoll gelöst und ohne Schütteln inkubiert wurde. Gezeigt werden über mehrere Messungen gemittelte Assays inkl. Standardabweichung.

Ein Vergleich zwischen *non-binding*- und den zuvor standardmäßig verwendeten *medium-binding*-Mikrotiterplatten zeigt, dass die Verwendung nicht bindender Platten zu verkürzten Lagzeiten einerseits und einer verringerten ThT Intensität in der Plateauphase andererseits führt (vgl. Abb. 5.6). Für die geringere Lagzeit bei nicht-bindenden Mikrotiterplatten gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze: Zum einen könnten die *medium-binding* Mikrotiterplatten verstärkt Monomere absorbieren, sodass die Aggregation effektiv bei geringerer Konzentration stattfinden, was zu einer verlängerten Lagzeit führt. Zum anderen könnten sich auch bereits gebildete Aggregate an der Oberfläche der *medium-binding* Mikrotiterplatten ablagern, wohingegen sie bei der nicht-bindenden Variante in Lösung bleiben und so dem Aggregationsprozess und insbesondere auch sekundären Nukleationspfaden weiter zur Verfügung stehen. Beide Effekte könnten natürlich auch kombiniert stattfinden. Die geringere ThT Intensität in der Plateauphase bei der Verwendung von *non-binding* Mikrotiterplatten spricht für einen Wegfall oder zumindest eine Reduktion heterogener Keimbildung an Oberflächen, sodass diese Prozesse für die Auswertung der Aggregationskinetiken des A $\beta$ -Peptids vernachlässigt werden können.

Aus den hier diskutierten Experimenten ergaben sich damit die folgenden Aggregationsbedingungen für das A $\beta$ -Peptid, um ein möglichst einfaches Modellsystem zur Analyse der Aggregationskinetik annehmen zu können: Das pH13-Protokoll zur Präparation von A $\beta$ -Lösungen stellt rein monomere Lösungen als Ausgangspunkt der Aggregation für beide Peptide sicher. Keimbildung an nicht-fibrillären Aggregaten kann damit nur noch stattfinden, wenn diese durch einen konkurrierenden Aggregationspfad während der Fibrillierung selbst erzeugt werden. Durch eine Inkubation ohne Schütteln und die Verwendung von *non-binding* Mikrotiterplatten werden zudem Fragmentation und heterogene Keimbildung an Oberflächen und andere Oberflächeneffekte unterdrückt. Die TEM-Aufnahmen in Abb. 5.7 zeigen eindeutig, dass mit diesem Protokoll sowohl A $\beta$ 40 als auch A $\beta$ 42 bis zu  $\sim 2 \mu$ M lange dünne Fibrillen bilden.

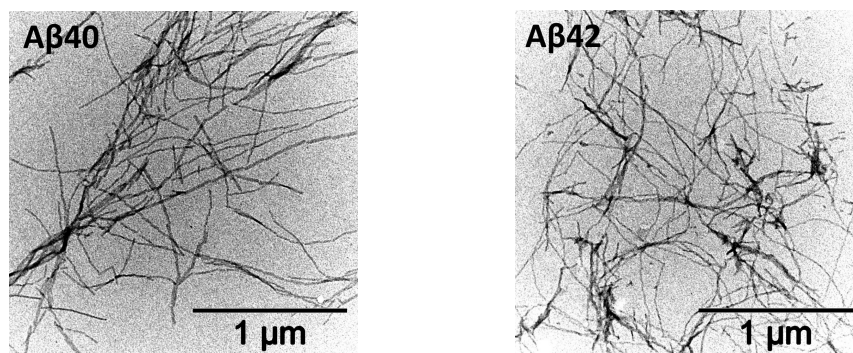


Abbildung 5.7.: **Entstehung von A $\beta$ -Fibrillen durch das *pH13-Protokoll*** A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 wurde nach dem oben beschriebenen *pH13-Protokoll* ohne Schütteln in nicht-bindenden Mikrotiterplatten präpariert und die Aggregationskinetik mittels ThT Assays aufgenommen. Die TEM-Aufnahmen wurden im Anschluss erstellt

### 5.3. Aggregationskinetik von A $\beta$ 40

Erst die Aufnahme von Aggregationskinetiken bei verschiedenen initialen Monomerkonzentrationen ermöglicht die Verknüpfung der experimentell beobachtbaren Kinetiken mit intrinsischen mikroskopischen Größen der Aggregation wie Geschwindigkeitskonstanten, die Grundlage einer modellhaften Beschreibung des Aggregationsprozesses sind [56]. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung eines Primär- oder Sekundärkeims  $k_{01}$  und  $k_{02}$ , dessen Konformationsänderung hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt begünstigenden Struktur  $k_{conv}$  und die Elongation  $k_+$  sowie die Reaktionsordnungen von Primär- und Sekundärkeimbildung  $n_{c1}$  und  $n_{c2}$  sollten - in einem Konzentrationsbereich, für den von einem gleich bleibenden Aggregationsmechanismus ausgegangen werden kann - unabhängig von der initialen Monomerkonzentration sein. Grundlage der nun folgenden Analyse der Aggregationskinetik von A $\beta$ 40 bildet daher die Aufnahme von ThT Assays unter den in 5.2 herausgearbeiteten Bedingungen bei verschiedenen Konzentrationen im Bereich zwischen 2  $\mu$ M und 160  $\mu$ M. Dabei wurden für jede Konzentration mindestens drei ThT Assays aufgenommen.

Entsprechend der in Kapitel 3.4.4 vorgestellten Analyse wurde zunächst an jeden einzelnen Assay eine sigmoidale Fitfunktion der in Gleichung 3.38 gegebenen Form angepasst. Aus den Resultaten dieser Fits wurden dann die Lagzeit  $t_{lag}$ , die Länge der Wachstumsphase  $T2$  und die relative Länge von Lag- und Wachstumsphase zueinander, genannt  $L_{rel}$  bestimmt und für jede Konzentration Mittelwert und Standardabweichung dieser Größen errechnet.

Anschließend wurden alle ThT Assays gemäß Gleichung 3.39 mit Bezug auf den Unterschied der ThT Intensität zwischen Lag- und Plateauphase normiert. Aus allen normierten Assays einer Konzentration wurde dann der Mittelwert gebildet. War die Länge der Wachstumsphase kürzer als die statistische bedingte Differenz der Lagzeiten der verschiedenen Assays einer einzelnen Konzentration, wurde dabei nicht über die zu einem bestimmten Zeitpunkt erreichte Intensität gemittelt, sondern das zeitliche Mittel bei einer konstanten Intensität gebildet. Dadurch wird eine Verfälschung des Anstiegs während der Wachstumsphase verhindert (s. Abb.B.1 in Anhang B.1). Für diese gemittelten Kurven wurde abschließend ein globaler Fit entsprechend der Modelle in [26, 27] durchgeführt (s. dazu auch Kap. 2.2.3 bzw. Glg. 3.46).

#### Konzentrationsabhängigkeit der makroskopischen Zeitkonstanten $t_{lag}$ , $t_{50}$ , $T2$ und $L_{rel}$

Die Abbildungen 5.8 und 5.9 zeigen die Konzentrationsabhängigkeiten von  $t_{lag}$  und  $t_{50}$  für A $\beta$ 40 jeweils bei Raumtemperatur und bei 37°C. Dabei wurde für die jeweilige Zeit die Standardabweichung der Messungen als Fehler angegeben, wohingegen der Fehler für die Konzentration etwa der Symbolgröße entspricht.

Auffällig bei Betrachtung der Daten ist vor allem, dass nicht über den gesamten Konzentrations-



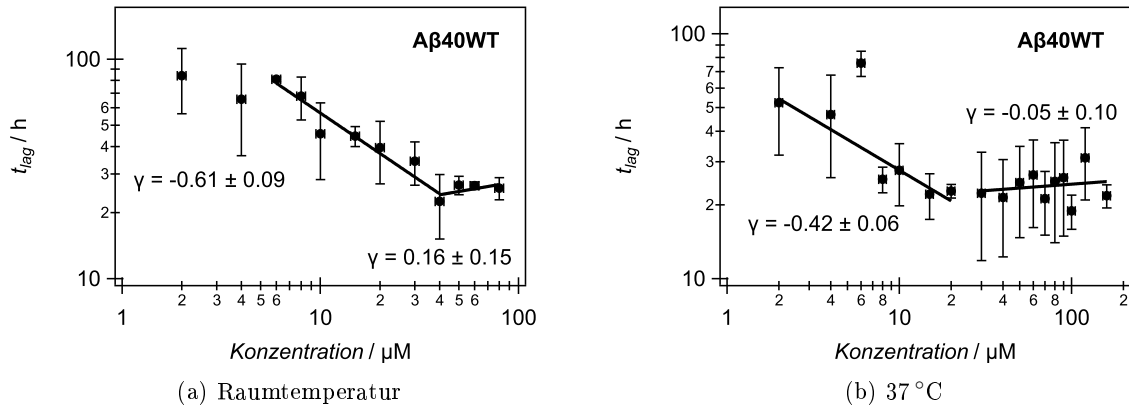


Abbildung 5.8.: **Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit bei Raumtemperatur und bei 37 °C** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes und die erhaltene Potenz  $\gamma$ . Auffällig ist hierbei der Übergang in eine Sättigung bei hohen Konzentrationen sowie eine verringerte Konzentrationsabhängigkeit bei niedrigeren Konzentrationen.

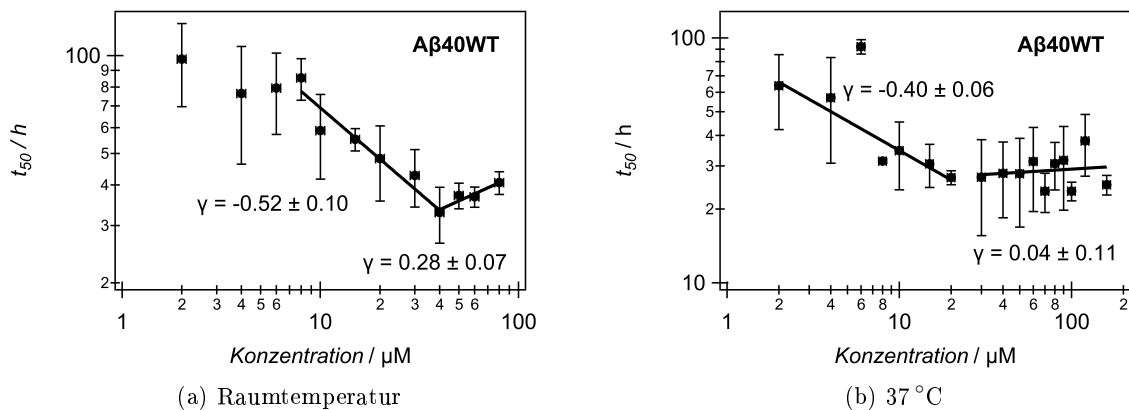


Abbildung 5.9.: **Konzentrationsabhängigkeit der Halbzeit bei Raumtemperatur und bei 37 °C** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes und die erhaltene Potenz  $\gamma$ . Bei hohen Konzentrationen geht die Konzentrationsabhängigkeit in eine Sättigung oder gar einen Anstieg über, der mit den bislang für A $\beta$ 40 bekannten Modellen nicht erklärt werden kann.

bereich die prognostizierte negative Potenzabhängigkeit beobachtet werden kann. Unterhalb von 6  $\mu\text{M}$  kann bei Raumtemperatur keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit beobachtet werden; bei der Halbzeit setzt diese sogar erst ab 8  $\mu\text{M}$  ein. Dagegen kann bei 37 °C bereits ab 2  $\mu\text{M}$  eine mit der Konzentration abnehmende Lag- und Halbzeit festgestellt werden. Oberhalb von 20  $\mu\text{M}$  gehen beide Observablen unter physiologischen Bedingungen in eine Sättigung über. Über ein solches Sättigungsverhalten wurde bereits für rekombinantes A $\beta$ 40 berichtet [55]. Für die Lagzeit ist eine Veränderung der Konzentrationsabhängigkeit ebenfalls beobachtbar bei Raumtemperatur ab 40  $\mu\text{M}$ , die Halbzeit geht hier jedoch in einen Anstieg über. Ein solcher Anstieg wurde als erstes von *Ziaunys et al.* [141] für Insulin beobachtet und mit einem „Capping“ genannten Inhibitionseffekt durch Oligomere, die sich an das Fibrillenende anlagern und so die Monomeraddition behindern, erklärt. Bei der Lagzeit ist aufgrund des Fehlerbereichs der Potenzanpassung nicht eindeutig ersichtlich, ob es um eine Sättigung oder wie bei der Halbzeit um einen Anstieg handelt. Das erste Szenario, ein Anstieg der Halbzeit, ohne dass daraus auch ein Anstieg der Lagzeit resultiert, wurde in theoretischen Berechnungen mit einer parallelen Aggregation von globulären Oligomeren und krummlinigen Protofibrillen, die sich nicht zu Amyloidfibrillen entwickeln und auch nicht mit Intermediaten der Amyloidaggregation wechselwirken, in Verbindung gebracht; allerdings sollte in diesem Fall die Lagzeit weiter kontinuierlich mit zunehmender Konzentration abnehmen [142, 143].

*Perez et al.* beobachteten das zweite Szenario eines gleichzeitigen Anstiegs von Lag- und Halbwertszeit für Lysozym und ein durch einen kovalent gebundenen Linker künstlich erzeugtes A $\beta$ 40-Dimer [143]. Wie *Zyaunis et al.* gingen sie von einem Inhibitionseffekt durch Oligomere aus. Für A $\beta$ 40 selbst war ein Anstieg der Halb- und ggf. Lagzeit mit zunehmender Konzentration zum Zeitpunkt der Experimente und ihrer Analyse noch nicht beobachtet worden<sup>2</sup>; zwischenzeitlich ist jedoch eine Arbeit von *Hasecke et al.* [144] erschienen, die diesen Anstieg ebenfalls für A $\beta$ 40 zeigt. Die Autoren führten den Anstieg auf eine Inhibition der Sekundärkeimbildung zurück. Dabei stützen sie sich auf Experimente, bei denen die aggregierende Lösung zusätzlich globuläre Oligomere und Protofibrillen enthielt, die aus dem oben angesprochenen künstlich hergestellten A $\beta$ 40-Dimer aufgebaut sind. Ihre Daten wurden mittels des Modells von *Meisl et al.* [56] analysiert, das Oligomere und die Konformationsänderung hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt-begünstigenden Struktur noch nicht explizit berücksichtigt. Die Diskussion möglicher Ursachen für das von der Erwartung eines kontinuierlichen Abfalls von Lag- und Halbwertszeit über den gesamten Konzentrationsbereich abweichende Verhalten soll jedoch an späterer Stelle fortgesetzt werden (s. Kap. 5.5) und stattdessen zunächst der mittlere Konzentrationsbereich besprochen werden, auf den sich die in den Gleichungen 3.40 bis 3.43 genannte Abschätzung anwenden lässt.

Die sich aus  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  zusammensetzende apparente Potenz  $\gamma$  beträgt bei Raumtemperatur  $\gamma = -0.61 \pm 0.09$  für die Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit und  $\gamma = -0.52 \pm 0.10$  für die Konzentrationsabhängigkeit der Halbwertszeit. In beiden Fällen ergibt sich daraus als maximale Größe für den Primärkeim ein Dimer, als Sekundärpfad beträgt die Reaktionsordnung maximal eins. Der maximal mögliche Primärkeim ergibt sich aus der Annahme, dass keine Sekundärkeimbildung stattfindet und die apparente Potenz  $\gamma \approx \gamma_1$  ist. Dann ist  $nc1 \approx 1.22$  ohne Berücksichtigung von Oligomeren und  $nc1 \approx 1.83$  unter Berücksichtigung von Oligomeren (s. auch Kap. 3.4.5). Geht man hingegen davon aus, dass die Sekundärkeimbildung stark dominiert und  $\gamma \approx \gamma_2$  ist, ergeben sich  $nc2 \approx 0.22$  bzw.  $nc2 \approx 0.83$  ohne und mit Berücksichtigung von Oligomeren. Daraus resultiert die maximale Reaktionsordnung von eins für die Sekundärkeimbildung. Da sich aus der hier angewendeten Analyse keine Rückschlüsse ziehen lassen, ob Primär- oder Sekundärpfad dominieren, ist eine weitergehende Aussage an dieser Stelle nicht möglich. Betrachtet man dagegen die bei 37°C aufgenommenen Daten, überschreitet sowohl die Konzentrationsabhängigkeit von  $t_{lag}$  als auch  $t_{50}$  mit  $\gamma = -0.42 \pm 0.06$  bzw.  $\gamma = -0.40 \pm 0.06$  den im Modell ohne Berücksichtigung von Oligomeren maximal möglichen Wert von  $\gamma = -0.5$ . Unter Berücksichtigung von Oligomeren ergäbe sich wie bei Raumtemperatur ein maximaler Primärkeim von  $nc1 \approx 1.26$  und als Sekundärkeim ein Monomer. Für den Sekundärpfad wäre aber auch ein Nichtkeimbildungsprozess denkbar oder eine Keimbildung, bei der die Fibrille selbst als Keim fungiert, da der Wert für  $nc2$  selbst bei der - physikalisch nicht möglichen - Annahme reiner Sekundärkeimbildung nahe null liegt.

Für die Abbildungen 5.10 und 5.11 wurden  $T2$  und  $L_{rel}$  doppelt- bzw. halb-logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Auch hier trägt das dieser Analyse zugrunde liegende Modell von *Dovidchenko et al.* [62] nur im Bereich mittlerer Konzentrationen:  $T2$  zeigt bei Raumtemperatur erst ab 8  $\mu\text{M}$  einen Abfall, bei beiden Temperaturen schließt sich oberhalb von 20  $\mu\text{M}$  ein Konzentrationsbereich an, indem ein Sättigungsverhalten bzw. ein Anstieg beobachtet werden kann. Hingegen zeigt  $L_{rel}$  bei Raumtemperatur einen durchgehenden Abfall, bei 37°C jedoch ebenfalls einen Anstieg oberhalb von 20  $\mu\text{M}$ .

Im mittels dieser Analyse auswertbaren Konzentrationsbereich ergeben sich bei Raumtemperatur kritische Nuklei der Größen  $nc1 = 2.09 \pm 0.49$  und  $nc2 = 0.52 \pm 0.44$ . Demzufolge wäre ein Dimer Ausgangspunkt der Primärkeimbildung. Für die Sekundärprozesse hingegen könnte  $nc2$  demzufolge entweder ein Monomer sein, das seine Konformation hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen stärker

<sup>2</sup>Die Experimente für diese Dissertation waren bereits Ende 2020 abgeschlossen, der Großteil der Analysen im Frühjahr 2021. Aufgrund äußerer Umstände konnte sie jedoch jetzt erst eingereicht werden. Die hier angesprochene Anstieg wurde schon am 23.10.2020 auf einem Poster präsentiert (s. Abb. B.2 in Anhang B.2). Die präsentierten Daten wurden damit unabhängig und parallel zu der Arbeit von *Hasecke et al.* [144], welche dieselbe Beobachtung publiziert haben, aufgenommen und analysiert.

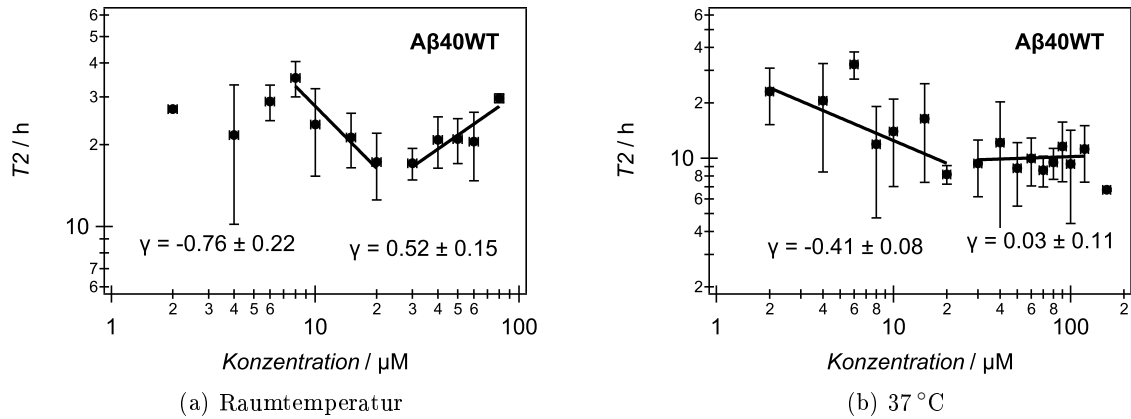


Abbildung 5.10.: **Konzentrationsabhängigkeit der Länge der Wachstumsphase bei Raumtemperatur und bei 37 °C** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes an in der doppel-logarithmischen Darstellung linear erscheinende Bereiche und die erhaltene Potenz  $\gamma$ . Dabei wurde in 5.10b der Datenpunkt bei 6  $\mu\text{M}$  als Ausreißer bei der Funktionsanpassung außen vorgelassen. Oberhalb von 20  $\mu\text{M}$  erhält man bei beiden Temperaturen ein Sättigungs- bzw. Anstiegsverhalten, das dem in [62] prognostizierten Verlauf widerspricht.

begünstigenden Konformation ändert, oder gleich null. Dies passt zu den Resultaten, die sich durch die Neuanalyse des Datensatzes von *Meisl et al.* durch *Dovidchenko et al.* für rekombinantes A $\beta$ 40 ergaben [63]. Dass für  $nc2$  auch eine Keimgröße von null rechnerisch möglich wäre, könnte auf einen Sekundärmechanismus hinweisen, bei dem die Oberfläche der bereits existierende Fibrille selbst als „Keim“ sich neu bildender Fibrillen fungiert [145]. Bei 37 °C lässt sich physikalisch sinnvoll einzig  $nc2=0$  annehmen. Auch hier handelt es sich den Ergebnissen dieses Modells folgend also nicht um eine klassische Sekundärkeimbildung. Für den Primärkeim erhält man dann  $nc1=1.78\pm 0.36$ , womit ein Dimer der wahrscheinlichste Nukleus ist.

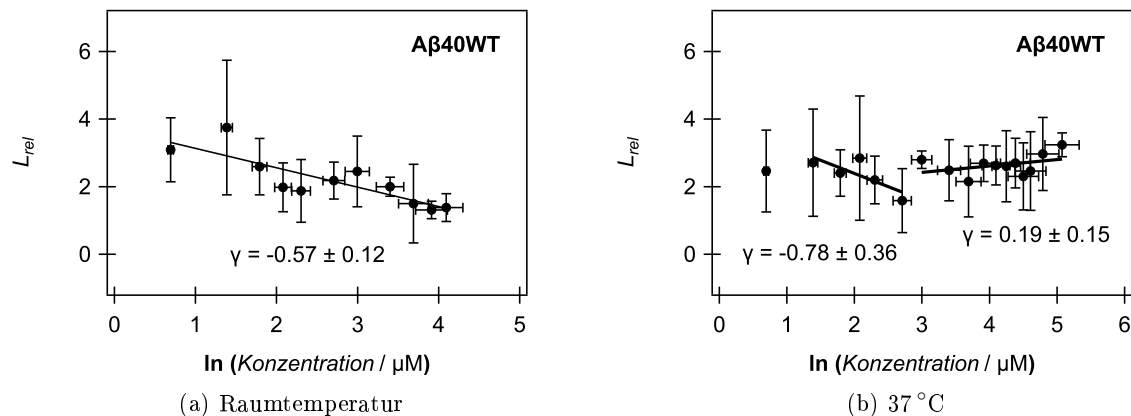


Abbildung 5.11.: **Konzentrationsabhängigkeit von  $L_{rel}$  bei Raumtemperatur und bei 37 °C** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes an in der halb-logarithmischen Darstellung linear erscheinende Bereiche und die erhaltene Potenz  $\gamma$ .

Die mit diesem Modell erhaltenen Ergebnisse passen damit gut zu den Resultaten, die sich aus der Auswertung von  $t_{50}$  und  $t_{lag}$  ergeben. Beide Modelle haben jedoch im Konzentrationsbereich bis etwa 20  $\mu\text{M}$  und bei Raumtemperatur zusätzlich erst oberhalb von 4-6  $\mu\text{M}$  Gültigkeit.

### Konzentrationsabhängiges Verhalten der ThT-Fluoreszenzintensität

Da eine genaue Distinktion von Primär- und Sekundärprozessen allein durch die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit makroskopischer Zeitobservablen nicht möglich ist, soll in diesem mittleren Konzentrationsbereich ein globaler Fit unter Verwendung erweiterter Modelle, die Oligomere berücksichtigen (vgl. Kap. 2.2.3 und [27, 26]), die Kinetiken genauer analysieren. Diese Modelle sind allerdings nur dann anwendbar, wenn die am Ende des Aggregationsprozesses erhaltene Plateauintensität proportional mit der Ausgangskonzentration der Monomere ansteigt.

Abbildung 5.12 zeigt die zu Beginn der Plateauphase gemessene Intensität der ThT Fluoreszenz in Abhängigkeit der initialen Monomerkonzentration. Bei Raumtemperatur kann die Proportionalität zwischen Monomerkonzentration und Plateau-Intensität allerdings nur bis 40  $\mu\text{M}$  beobachtet werden, dann geht die Abhängigkeit in eine Sättigung über bzw. zeigt zumindest einen deutlich geringeren Anstieg. Dieses Verhalten kann bei 37°C nicht beobachtet werden; im Gegenteil steigt hier ab 80  $\mu\text{M}$  die Plateauintensität deutlich stärker mit der Konzentration an.

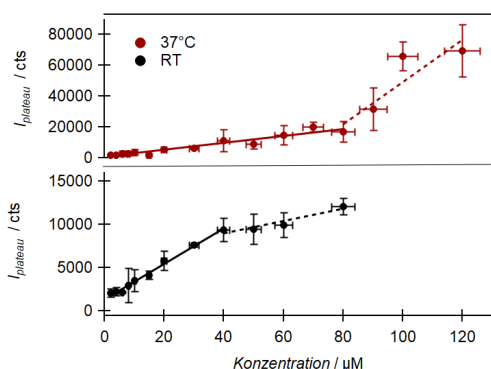


Abbildung 5.12.: **Konzentrationsabhängigkeit der ThT Intensität in der Plateauphase** Mittelwerte und Standardabweichungen der für Aggregationskinetiken mit der gleichen initialen Monomerkonzentration beobachteten ThT Fluoreszenz in der Plateauphase bei 37°C und bei Raumtemperatur. Die linearen Funktionsanpassungen verdeutlichen die veränderte Abhängigkeit der Plateauintensität von der Konzentration bei höheren Konzentrationen.

Eine mögliche Erklärung für die Sättigung bei Raumtemperatur wäre eine unzureichende ThT-Konzentration im Vergleich zur Proteinkonzentration. Dies würde aber nicht eine apparent verlangsamte Aggregation bei hohen Konzentrationen erklären. Deswegen ist wahrscheinlicher, dass die Aggregation selbst einer Veränderung unterliegt. Dies könnte zum einen ein Sättigungsprozess sein, wie er in der Literatur für A $\beta$ 40 bereits beobachtet wurde [55]. Diese Sättigung würde aber nicht die erhöhten Lag- und Halbwertszeiten in den Abbildungen 5.8 und 5.9 erklären. Zudem ging die dort beschriebene Sättigung der Sekundärkeimbildung nicht mit einer veränderten Proportionalität zwischen ThT Intensität in der Plateauphase und initialer Monomerkonzentration einher [55]. Zum anderen könnte - wie bereits bei der Analyse der Lag- und Halbwertszeiten angedacht - bei höheren Konzentrationen ein anderer Aggregationsmechanismus oder ein zusätzlicher konkurrierender Prozess vorliegen. Ein solcher Konkurrenzprozess wäre die Generation von - ggf. inhibierend wirkenden - *Off-pathway*-Oligomeren [57, 146]. Dieser Konkurrenzprozess könnte eine kritische Konzentration besitzen, die von derjenigen der Amyloidfibrillierung selbst abweicht [143], sodass sich dessen Einsetzen ggf. in der Plateauintensität widerspiegelt. Vor einer genaueren Betrachtung möglicher Erklärungen für das Aggregationsverhalten bei hohen Konzentrationen (s. Kap. 5.5) sollen jedoch zusätzlich zu den bereits diskutierten kritischen Keimgrößen auch die Geschwindigkeitskonstanten der Aggregation im Bereich mittlerer Konzentrationen mittels eines globalen Fits bestimmt werden.

### Bestimmung der Nukleationskenngrößen aus einem globalen Fit

Abbildung 5.13 stellt das Resultat der globalen Funktionsanpassungen gemäß Gleichung 3.46 für A $\beta$ 40 bei Raumtemperatur und bei 37°C im mittleren Konzentrationsbereich dar, der einen Abfall der Halbzeiten mit zunehmender Konzentration zeigt.

Für die Parameter der globalen Funktionsanpassung ergeben sich die in Tabelle 5.1 aufgeführten Werte. Sie bestätigten die bisherigen Resultate, dass ein Dimer Keim des Primärkeimbildungspfad

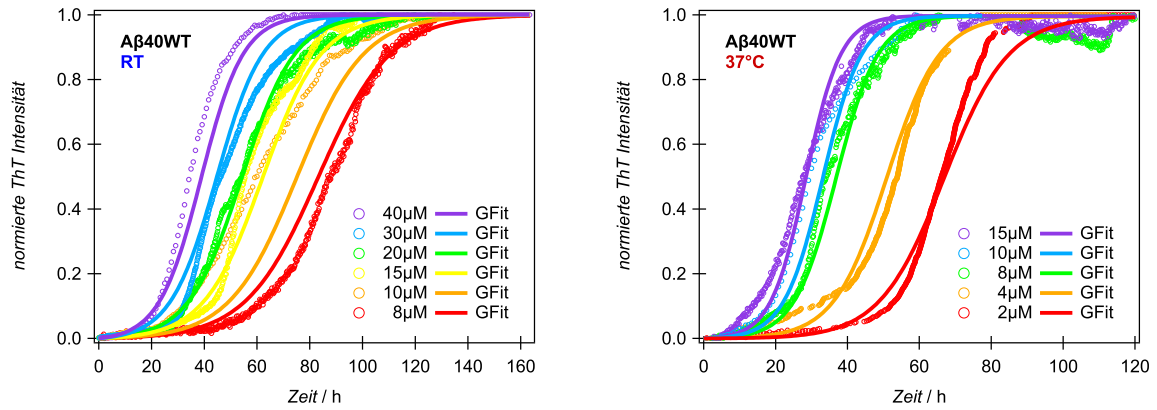


Abbildung 5.13.: **Globaler Fit an Konzentrationsserien von A $\beta$ 40WT bei Raumtemperatur und bei 37 °C** Jeder dargestellte ThT Assays entspricht einer Mittelung von mindestens 3 je Konzentration gemessenen Assays. Der Konzentrationsbereich entspricht demjenigen in Abbildung 5.9, in dem  $t_{50}$  mit zunehmender Konzentration abfällt und eine Potenzfunktion zur Bestimmung von  $n_{c1}$  und  $n_{c2}$  angepasst wurde.

ist. Für die Sekundärkeimbildung scheint kein eigener Keim benötigt zu werden - hier könnten bereits existierende Fibrillen diese Funktion übernehmen (Template-Effekt). Ein solcher sekundärer Mechanismus wurde auch für rekombinantes A $\beta$ 40 bereits postuliert [145]. Er widerspricht allerdings den - auf Vorgängermodellen ohne Berücksichtigung von Oligomeren basierenden - Ergebnissen von *Meisl et al.* [55], denen zufolge auch die Sekundärkeimbildung mittels Dimerkeimen verläuft.

Temperatur	$n_{c1}$	$n_{c2}$	$kkk1 / \mu\text{M}^{-n_{c1}/3}\text{h}^{-1}$	$kkk2 / \mu\text{M}^{-(n_{c2}+1)/3}\text{h}^{-1}$
RT	$1.76 \pm 0.05$	$0.01 \pm 0.05$	$0.0033 \pm 0.0002$	$0.0288 \pm 0.0013$
37 °C	$1.88 \pm 0.05$	$0 \pm 0.04$	$0.0065 \pm 0.0002$	$0.0679 \pm 0.0016$

Tabelle 5.1.: **Übersicht der Nukleationskenngrößen von A $\beta$ 40** Aufgeführt sind die Fitparameter, die sich aus den in Abb. 5.13 dargestellten globalen Funktionsanpassungen ergeben. Auch die angegebenen Fehlerbereiche entstammen der Ausgabe des globalen Fits.

Dass sich keine ganzzahligen Werte für  $n_{c1}$  ergeben, kann zum einen Relikt der Funktionsanpassung sein, die nicht auf ganzzahlige Werte festgelegt wurde, könnte aber auch eine reale physikalische Entsprechung haben: Dass nämlich neben einem Hauptpfad vermittelt eines Dimers noch ein weiterer, mit einem Monomer als Primärkeim möglich ist, der die entsprechende mittlere Reaktionsordnung zu kleineren Werten verschiebt. Der globale Fit zeigt zudem, dass die Geschwindigkeitskonstante der Sekundärkeimbildung jeweils um einen Faktor zehn größer ist als die der Primärkeimbildung, was für eine Dominanz der Sekundärkeimbildung spricht. Beide Geschwindigkeitskonstanten verdoppeln sich durch die Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf 37 °.

Allen bisherigen Resultaten ist gemein, dass sie auf *a priori* als zutreffend angenommenen Modellen basieren. Allerdings können vergleichende FCS-Messungen mit Atto488-A $\beta$ 40 vor Beginn der Aggregation bei pH 13, unmittelbar nach dem Wechsel zu einem pH-Wert von pH 7.5 und damit dem Start der Aggregation und in der Plateauphase die Annahme eines Dimers als kritischen Keims der Primärkeimbildung stützen: Aus ihnen ergibt sich bei pH 13 ein hydrodynamischer Radius von 1.1 nm, was unter Berücksichtigung des kovalent gebundenen Farbstoffs einem Monomer entspricht [147].

Sowohl zu Beginn als auch nach Abschluss der Aggregation können im Gegensatz dazu Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 1.4 nm beobachtet werden (vgl. Abb. 5.14). Unter

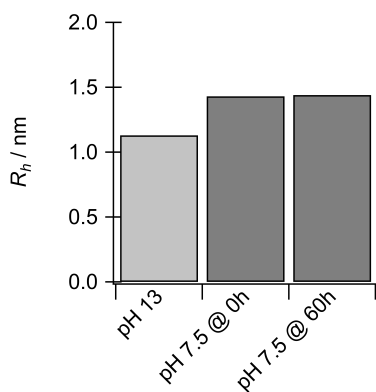


Abbildung 5.14.: **Beobachtete  $A\beta_{40}$ -Oligomere vor, zu Beginn und nach Abschluss der Fibrillierung** Während in der Präparationslösung bei pH 13 wie erwartet nur Monomere durch FCS-Messungen beobachtet werden können, lässt der gemessene hydrodynamische Radius bei Beginn der Aggregation (0h) und in der Plateauphase (60h) auf das Vorhandensein globulärer Dimere schließen.

der Annahme globulärer Aggregate entspricht dies einem Dimer. Am wahrscheinlichsten erscheint daher ein Szenario, in dem sich durch die Reduktion des pH-Werts ungeordnete Dimere bilden, welche durch eine Konformationsänderung einen Keim bilden können. Diese Konformationsänderung wäre dann der geschwindigkeitslimitierende Schritt der primären Keimbildungsreaktion und das „ $\beta$ -Dimer“ primärer Nukleus. Diese Annahme wird weiterhin dadurch gestützt, dass ein solches  $\beta$ -Dimer mehrfach als Grundbaustein von  $A\beta_{40}$ -Fibrillen identifiziert wurde (s. bspw. [148, 149]). Die gezeigten Resultate der FCS-Messungen bestätigen damit die aus Modellannahmen errechnete Größe des Primärkeims. Damit erscheint der angewandte globale Fit als geeignet, zugrunde liegende mikroskopische Prozesse tatsächlich zu beschreiben.

Wie aber beeinflusst der Austausch einer Aminosäure durch Prolin, das bekannt dafür ist, die Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helixen potentiell zu behindern, den Keimbildungsprozess? Ist bei den zwei  $A\beta_{40}$ -Varianten  $A\beta_{40}E22P$  und  $A\beta_{40}G37P$  ebenfalls ein unstrukturiertes Dimer Ausgangspunkt der Aggregation? Und zeigen sie wie der Wildtyp bei geringen und hohen Konzentrationen ein von der Modellprognose abweichendes Verhalten - und falls ja, verhalten sie sich in gleicher Weise?

#### 5.4. Aggregationskinetik der $A\beta_{40}$ -Varianten E22P und G37P

Für die Analyse zweier  $A\beta_{40}$ -Varianten mit Prolinmutation wurden die Peptide  $A\beta_{40}E22P$ , bei dem die Glutaminsäure an der 22. Stelle des  $A\beta_{40}$ -Peptids durch Prolin ersetzt wurde, und  $A\beta_{40}G37P$ , bei dem das Glycin an der 37. Stelle mit Prolin ausgetauscht wurde, ausgewählt. Für beide Varianten weicht die kritische Monomerkonzentration der Fibrillierung  $C_r$  nur geringfügig von den  $0.9 \mu\text{M}$  ab, die für  $A\beta_{40}WT$  beobachtet wurden [136]. Die relative Differenz  $\Delta\Delta G$  der Gibbs'schen freien Energie  $\Delta G$  der Fibrillenbildung zum Wildtyp beträgt für  $A\beta_{40}E22P$   $\Delta\Delta G \approx -0.3 \text{ kcal/mol}$ , das damit eine etwas höhere Stabilität aufweist als der Wildtyp, und im Vergleich eine höhere Fibrillierungseffizienz zeigt; im Gegensatz dazu ist die Fibrille von  $A\beta_{40}G37P$  mit  $\Delta\Delta G \approx 0.4 \text{ kcal/mol}$  etwas weniger stabil als  $A\beta_{40}WT$  und fibrilliert weniger effektiv [136].

Mehrere Varianten des  $A\beta$ -Peptids mit einer Mutation an der 22. Stelle wurden mit dem Auftreten von zerebraler Amyloidangiopathie (kurz CAA von engl. *cerebral amyloid angiopathy*), einer Erkrankung zerebraler Blutgefäße durch die Ablagerung von Amyloiden, und der familiären Alzheimer-Krankheit (kurz FAD von engl. *familial Alzheimer's disease*) in Verbindung gebracht [150, 151, 152, 153]. Für die CAA-Varianten wurde ein Verlust der in einigen  $A\beta$ -Strukturmodellen angenommenen E22-K28-Salzbrücke festgestellt [154]. Eine Mutation an der 22. Stelle kann daher die Aggregationskinetik deutlich verändern: Mit CAA und FAD in Verbindung gebrachte Varianten mit einer Mutation an der 22. Stelle aggregieren schneller und besitzen eine höhere Neurotoxizität als der Wildtyp [152]. Bei der in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefundenen sogenannte Osaka-Variante E22 $\Delta$  wird gar die Fibrillenbildung zugunsten toxischer Oligomere unterdrückt [119]. Dies lieferte den ersten Hinweis auf die Validität der Oligomer-Hypothese, die besagt, dass

kleine Intermediate und nicht etwa die finalen Amyloidfibrillen die für die Entwicklung von Alzheimer entscheidende neurotoxische Spezies seien [119]. Im Gegensatz zu den potentiell die Aggregation beschleunigenden A $\beta$ -Varianten mit einer Mutation an der 22. Stelle, erschweren Mutationen im Bereich des C-Terminus zumeist die Keimbildung [155, 156], sodass mit A $\beta$ 40E22P eine potentiell die Aggregation begünstigende und mit A $\beta$ 40G37P eine vermutlich inhibierend wirkende Variante gewählt wurde.

Der native Zustand des A $\beta$ -Peptids hängt in hohem Maße von den umgebenden Bedingungen wie pH-Wert und Ionenstärke der Lösung ab [13]. Da für die in dieser Arbeit genutzten Inkubationsbedingungen nach meinem Kenntnisstand noch keine A $\beta$ -Monomerstruktur veröffentlicht wurde, kann hier keine fundierte Aussage über eine mögliche Veränderung durch die Prolin-Mutation getroffen werden. Sollte die native Struktur wie bei der unter den ähnlichsten Bedingungen (d.h. gelöst in 20 mM Phosphatpuffer mit 50 mM NaCl bei pH 7.3) mittels NMR gefundenen Konformation (s. [157]) aussehen, hieße das, dass sich die 22. Stelle innerhalb einer  $\alpha$ -Helix befände und die 37. Stelle im ungeordneten C-Terminus. Durch die E22P-Variante könnte damit tendenziell die  $\alpha$ -Helix der nativen Struktur destabilisiert und eine Konformationsänderung beschleunigt werden.

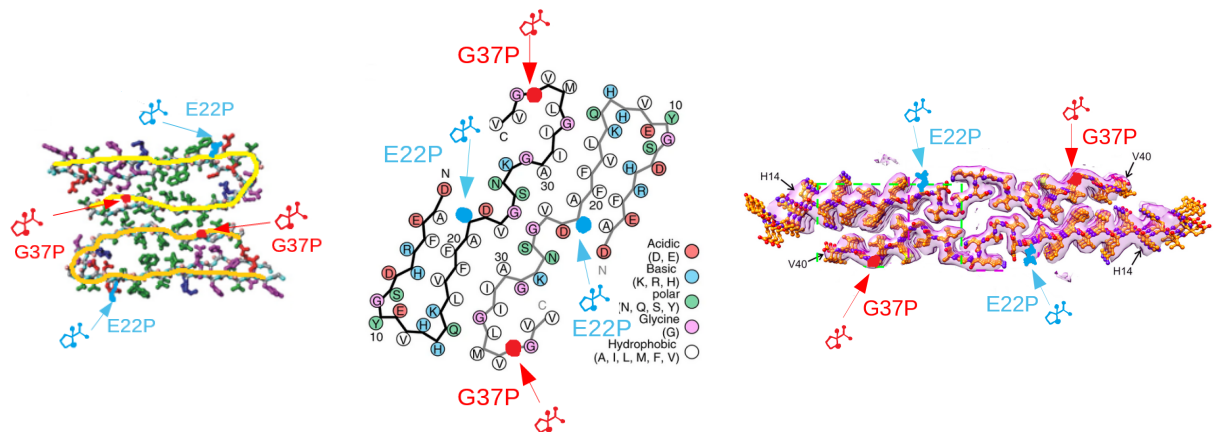


Abbildung 5.15.: **Aktuelle Strukturmodelle von A $\beta$ 40-Fibrillen mit eingezeichneten Mutationen E22P und G37P** Die Stellen, an denen ein Prolin eingetauscht wurde, sind farbig in blau (E22P) und rot (G37P) markiert. Die Abbildungen wurden adaptiert von *Paravastu et al.*[67] (links), *Kollmer et al.* [148] (mittig) und *Ghosh et al.* [149] (rechts).

Abbildung 5.15 zeigt drei aktuelle Strukturmodelle von A $\beta$ 40-Fibrillen, bei denen die für die Varianten E22P und G37P vorgenommenen Mutationen farbig angezeigt werden. In den  $\beta$ -hairpin-Modellen von *Paravastu et al.* lägen beide Veränderungen innerhalb der  $\beta$ -Stränge, die G37P-Stelle allerdings im Innern der späteren Fibrille, und die E22P-Position außen. Erstere könnte also potentiell die Anordnung der beiden Monomere als  $\beta$ -hairpin erschweren. Im Gegensatz dazu säße bei *Kollmer et al.* die E22P-Mutation innerhalb der  $\beta$ -Stränge und die G37P-Mutation außen; bei *Ghosh et al.* lägen beide außen. Da unbekannt ist, welches der hier gezeigten Strukturmodelle, unter den für dieses Kapitel gewählten Aggregationsbedingungen zutrifft, kann hier keine weitere Aussage zu potentiellen Auswirkungen der Prolin-Mutationen auf die finale Struktur der Fibrille getroffen werden.

#### 5.4.1. Aggregationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp

A $\beta$ 40E22P und A $\beta$ 40G37P wurden wie der Wildtyp gemäß dem *pH13-Protokoll* präpariert und in Gegenwart von 20  $\mu$ M ThT inkubiert. TEM-Messungen, aufgenommen nach Erreichen der Plateauphase, zeigen, dass alle drei Varianten unter diesen Aggregationsbedingungen Fibrillen bilden (vgl. Abb. 5.16). Während die von A $\beta$ 40E22P gebildeten Fibrillen denen des Wildtyps ähneln, gibt es einen deutlichen Unterschied zu den Fibrillen von A $\beta$ 40G37P. Letztere sind mit zumeist 0.5-0.9  $\mu$ M

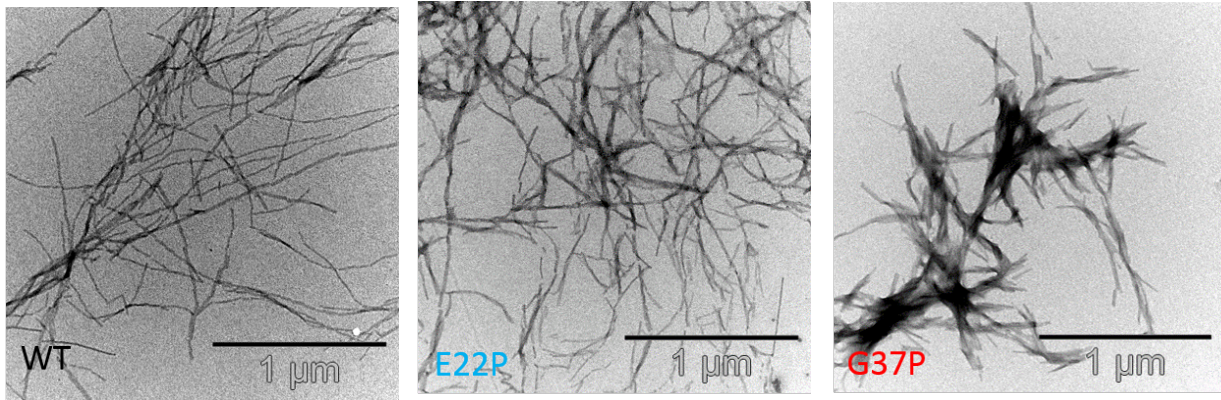


Abbildung 5.16.: **TEM-Aufnahmen der A $\beta$ 40-Varianten im Vergleich** Alle Lösungen wurden gemäß dem *pH13-Protokoll* inkubiert. Die initiale Monomerkonzentration betrug 40  $\mu$ M. Während A $\beta$ 40E22P-Fibrillen die gleiche Morphologie aufweisen wie A $\beta$ 40WT-Fibrillen, sind A $\beta$ 40G37P-Fibrillen kürzer, dicker und in Bündeln angeordnet.

Länge kürzer und dicker und scheinen sich zu Bündeln zusammen zu lagern.

Da in Kap. 5.3 dargelegten Analysen für alle drei Möglichkeiten der Bestimmung der kritischen Keimgrößen übereinstimmende Ergebnisse lieferten, wird an dieser Stelle auf einen erneuten Vergleich verzichtet.<sup>3</sup> Stattdessen soll zunächst mittels der Konzentrationsabhängigkeit von  $t_{50}$  der Bereich festgelegt werden, in dem das für den globalen Fit benutzte Modell Gültigkeit hat - d.h. der Bereich, in dem ein Abfall der Halbzzeit mit zunehmender Konzentration beobachtet werden kann. In diesem Bereich bestimmen dann globale Funktionsanpassungen gemäß Gleichung 3.46 die mikroskopischen Konstanten  $n_{c1}$ ,  $n_{c2}$ ,  $kkk1$  und  $kkk2$

### Bestimmung der kritischen Keimgrößen aus der Halbzzeit $t_{50}$

Die Abbildungen 5.17 und 5.18 zeigen die Konzentrationsabhängigkeit der Halbzzeit  $t_{50}$  bei Raumtemperatur bzw. 37 °C. Die Halbzzeit von A $\beta$ 40E22P fällt wie beim Wildtyp bei Raumtemperatur erst ab 8  $\mu$ M mit zunehmender Konzentration ab. Die Potenz des Abfalls ist mit  $\gamma = -1.10 \pm 0.29$  allerdings etwa doppelt so groß wie für A $\beta$ 40WT. Oberhalb von 40  $\mu$ M steigt für die E22P-Variante die Halbzzeit wieder an, auch hier scheint es also einen verlangsamen Prozess bei hohen Konzentrationen zu geben. Insgesamt ist die Aggregation beschleunigt gegenüber dem Wildtyp. Im Gegensatz

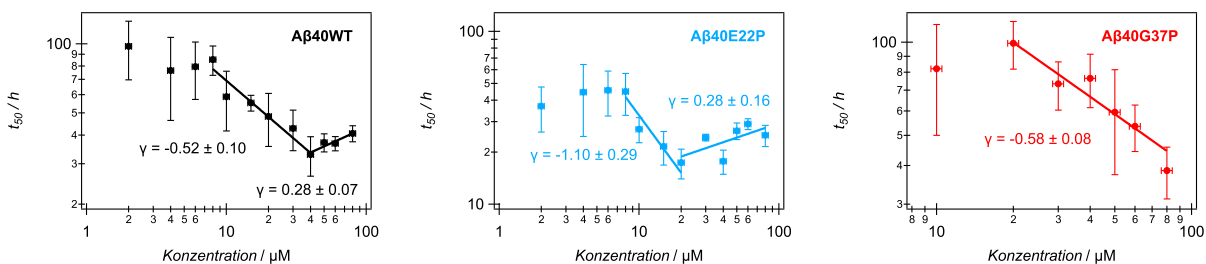


Abbildung 5.17.: **Konzentrationsabhängigkeit der Halbzzeit von A $\beta$ 40-Varianten bei Raumtemperatur** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes und die erhaltene Potenz  $\gamma$ . Ein negatives  $\gamma$  erhält man für A $\beta$ 40WT und A $\beta$ 40E22P nur unterhalb einer Konzentration von 40  $\mu$ M bzw. 20  $\mu$ M. Oberhalb dieser Konzentration ist für beide ein deutlicher Anstieg der Halbzzeit erkennbar.

dazu aggregiert A $\beta$ 40G37P deutlich langsamer. Zudem können erst ab 10  $\mu$ M überhaupt zuverlässig

<sup>3</sup>Die Konzentrationsabhängigkeiten von  $t_{lag}$ ,  $L_{rel}$  und  $T2$  sind in Anhang B.4 dargestellt.



Fibrillierungsprozesse initiiert werden. Bei den darunter liegenden Konzentrationen zeigten innerhalb der Messzeit von bis zu 160 h nur einzelne ThT Assays einen Anstieg der Fluoreszenz. Darauf, sie hinsichtlich makroskopischer Zeitkonstanten auszuwerten, wurde hier verzichtet, da sie das Ergebnis tendenziell hin zu zu niedrigen Halbzeiten verzerren würden. Eine mögliche Ursache für unzuverlässige Aggregation bei Konzentrationen unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  könnte sein, dass die kritische Monomerkonzentration der Fibrillierung - anders als bei *Williams et al.* - unter den gewählten Präparations- und Inkubationsbedingungen deutlich höher ist als für die anderen beiden Varianten. Ebenfalls möglich wäre, dass A $\beta$ 40G37P sich stärker an die Wände der Mikrotiterplatten anlagert und deshalb die effektive Monomerkonzentration deutlich geringer ist als die angegebene initiale Monomerkonzentration. Ab 20  $\mu\text{M}$  fällt die Halbzeit von A $\beta$ 40G37P dann mit einer Potenz von  $\gamma = -0.58 \pm 0.08$  mit zunehmender Konzentration ab; im Gegensatz zu den anderen beiden Varianten erstreckt sich dieser Abfall über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich.

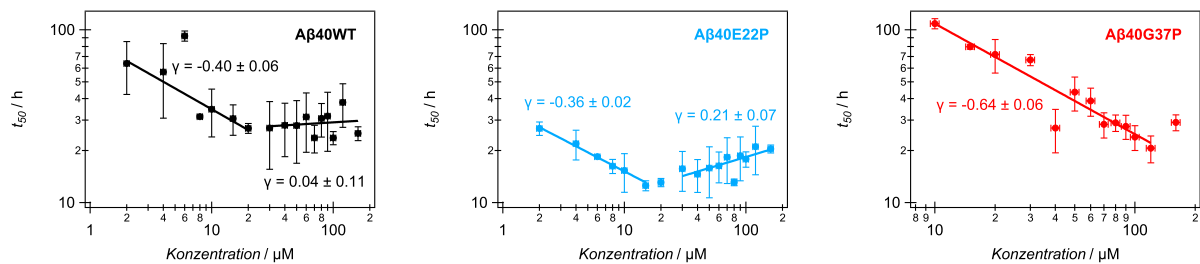


Abbildung 5.18.: **Konzentrationsabhängigkeit der Halbzeit von A $\beta$ 40-Varianten bei 37 °C** Ein-gezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes und die erhaltene Potenz  $\gamma$ . Ein negatives  $\gamma$  erhält man für A $\beta$ 40WT und A $\beta$ 40E22P unterhalb einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  bzw. 15  $\mu\text{M}$ . Bei höheren Konzentration geht die Halbzeit von A $\beta$ 40WT in eine Sättigung über, wohingegen für A $\beta$ 40E22P ein Anstieg der Halbzeit oberhalb von 30  $\mu\text{M}$  zu erkennen ist.

Auch bei 37 °C ähnelt das Verhalten von A $\beta$ 40E22P dem des Wildtyps. Der theoretisch erwartete Abfall der Halbzeit mit zunehmender Konzentration setzt direkt bei der niedrigsten gemessenen Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ein; es gibt hier kein konzentrationsunabhängiges Verhalten der Halbzeit bei niedrigen Konzentrationen. Wie schon bei Raumtemperatur ist  $t_{50}$  im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Ab 30  $\mu\text{M}$  steigen die gemessenen Halbzeiten mit der Konzentration deutlich an - während A $\beta$ 40WT in diesem Bereich ggf. eine bloße Sättigung zeigt, ist für die E22P-Variante hier wie bei Raumtemperatur eindeutig ein Anstieg vorhanden. Im Gegensatz dazu fällt die Halbzeit von A $\beta$ 40G37P über den gesamten auswertbaren Konzentrationsbereich kontinuierlich mit zunehmender Konzentration ab. Einzig der Wert bei der höchsten Konzentration 160  $\mu\text{M}$  könnte ggf. einen beginnenden Anstieg anzeigen.

Den bisherigen Auswertungen zufolge ähneln sich die Aggregationskinetiken von A $\beta$ 40WT und A $\beta$ 40E22P stark, auch wenn letztere Variante kürzere Lag- und Halbzeiten aufweist und auch höhere ThT Intensitäten in der Plateauphase (s. Abb. B.9 in Anhang B.5). Dagegen ist eine Diskrimination von A $\beta$ G37P nicht nur hinsichtlich der Morphologie (vgl. Abb. 5.16), sondern auch hinsichtlich einer Sättigung bzw. eines Anstiegs der Halbzeit erkennbar.

### Bestimmung der Nukleationskenngößen aus einem globalen Fit

Zur Bestimmung der charakteristischen Keimgrößen wurden die ThT Assays im Konzentrationsbereich, in dem ein kontinuierlicher Abfall der Halbzeit mit ansteigender Konzentration beobachtet werden konnte, für jede Konzentration gemittelt und an diese Mittelwert-Assays ein globaler Fit gemäß Gleichung 3.46 mit den globalen Parametern  $n_{c1}$ ,  $n_{c2}$ ,  $kkk1$  und  $kkk2$  angepasst. Das Resultat ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Für A $\beta$ G37P weicht der Fit unterhalb von 15-20  $\mu\text{M}$  stark vom beobachteten Assay ab, sodass die Assays bei 10  $\mu\text{M}$  nicht für den globalen Fit berücksichtigt

wurden. Gegebenenfalls spielen hier noch andere Effekte - etwa Oberflächeneffekte - eine Rolle, die bei höheren Konzentrationen nicht mehr ins Gewicht fallen, sodass das dem globalen Fit zugrunde gelegte Modell hier besser passt. Tendenziell ist der Trend, dass der Anstieg während der Wachstumsphase bei der geringsten Konzentration nicht gut durch den globalen Fit abgebildet wird, auch bei den anderen Varianten zu erkennen; dies spricht dafür, dass auch hier zusätzliche Prozesse stattfinden. Die Tabellen 5.2 und 5.3 führen die aus den globalen Fits resultierenden Parameterwerte bei

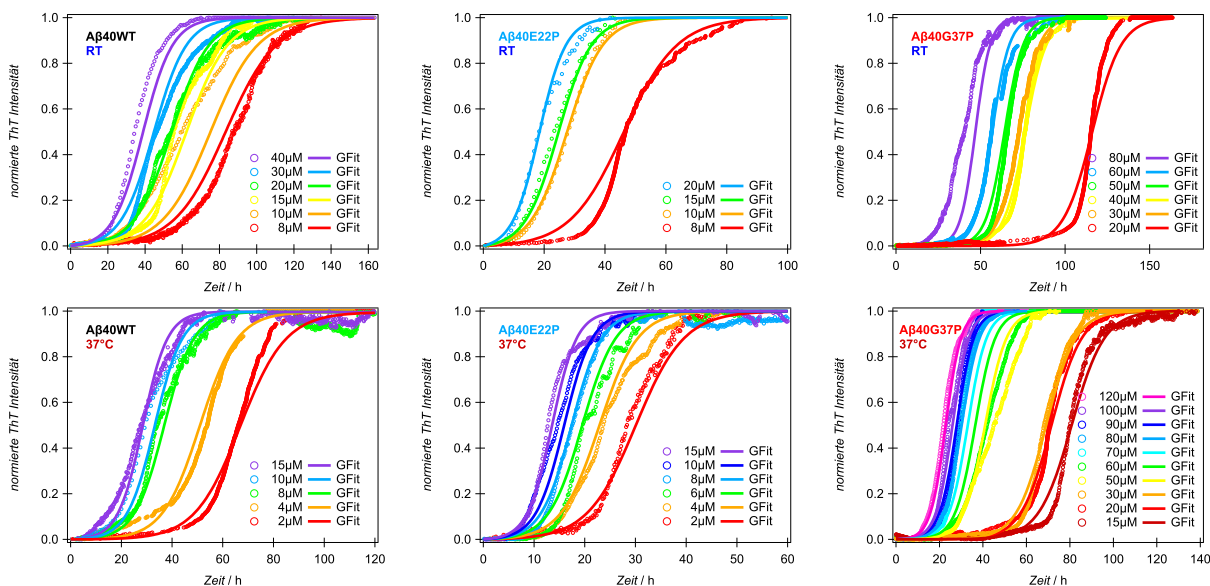


Abbildung 5.19.: **Globale Fits an Konzentrationsserien von A $\beta$ 40-Varianten** Dargestellt sind jeweils die aus mindestens drei Assays berechneten Mittelwert-Assays und das Resultat des globalen Fits.

Raumtemperatur bzw. 37° auf. Die Variante A $\beta$ E22P bildet bei 37° ein Monomer bis Dimer als Primärkeim für Fibrillen, an denen dann wie schon beim Wildtyp ohne dezidierten Sekundärkeim Sekundärprozesse ablaufen können. Passend zu der beobachteten schnelleren Aggregation ergibt sich mit  $kkk1=0.0219\pm 0.0007\ \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  eine etwa dreimal so große Geschwindigkeitskonstante für den Primärkeimbildungspfad wie für den Wildtyp bzw. mit  $kkk2=0.1325\pm 0.0039\ \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  eine doppelt so große für den Sekundärweg.

Variante	$n_{c1}$	$n_{c2}$	$kkk1 / \mu\text{M}^{-n_{c1}/3}\text{h}^{-1}$	$kkk2 / \mu\text{M}^{-(n_{c2}+1)/3}\text{h}^{-1}$
A $\beta$ 40WT	$1.88 \pm 0.05$	$0 \pm 0.04$	$0.0065 \pm 0.0002$	$0.0679 \pm 0.0016$
A $\beta$ 40E22P	$1.37 \pm 0.05$	$0 \pm 0.05$	$0.0219 \pm 0.0007$	$0.1325 \pm 0.0039$
A $\beta$ 40G37P	$3.24 \pm 0.04$	$0.15 \pm 0.02$	$0.00021 \pm 0.00002$	$0.036 \pm 0.001$

Tabelle 5.2.: **Übersicht der Nukleationskenngrößen bei 37°C** Ergebnisse resultierend aus globalen Fits an Konzentrationsserien aus mindestens 3 ThT Assays je Konzentration.

Die Geschwindigkeitskonstanten verringern sich bei Übergang zur Raumtemperatur für A $\beta$ 40E22P um etwa einen Faktor zehn auf  $kkk1=0.0021\pm 0.0011\ \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$  und  $kkk2=0.0185\pm 0.0127\ \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$ ; die Temperaturabhängigkeit ist demnach deutlich größer als beim Wildtyp, bei dem hier lediglich ein Faktor zwei beobachtet werden kann. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass sich für die primäre Reaktionsordnung bei Raumtemperatur  $n_{c1}=3.43\pm 0.59$  ergibt, statt eines Monomers oder Dimers also ein Trimer oder Tetramer für die primäre Keimbildung benötigt wird. Beim Wildtyp wurde hingegen temperaturunabhängig ein Dimer beobachtet. Auch  $n_{c2}$  vergrößert sich im Falle von A $\beta$ 40E22P bei Raumtemperatur auf  $n_{c2}=1.28\pm 0.82$ . Die Geschwindigkeitskonstanten sind

unter Berücksichtigung des Fehlerbereichs vergleichbar mit denen des Wildtyps.

Variante	$n_{c1}$	$n_{c2}$	$kkk1 / \mu\text{M}^{-n_{c1}/3}\text{h}^{-1}$	$kkk2 / \mu\text{M}^{-(n_{c2}+1)/3}\text{h}^{-1}$
A $\beta$ 40WT	$1.76 \pm 0.05$	$0.01 \pm 0.05$	$0.0033 \pm 0.0002$	$0.0288 \pm 0.0013$
A $\beta$ 40E22P	$3.43 \pm 0.59$	$1.28 \pm 0.82$	$0.0021 \pm 0.0011$	$0.0185 \pm 0.0127$
A $\beta$ 40G37P	$3.51 \pm 0.14$	$0.45 \pm 0.05$	$0.00004 \pm 0.00001$	$0.023 \pm 0.001$

Tabelle 5.3.: **Übersicht der Nukleationskenngrößen bei Raumtemperatur** Ergebnisse resultierend aus globalen Fits an Konzentrationsserien aus mindestens 3 ThT Assays je Konzentration.

A $\beta$ 40G37P benötigt hingegen sowohl bei Raumtemperatur mit  $n_{c1}=3.24\pm 0.04$  als auch bei 37 °C mit  $n_{c1}=3.51\pm 0.14$  ein Tri- oder Tetramer für die Primärkeimbildung. Der inhibierende Effekt der Mutation am C-Terminus scheint hauptsächlich auf die Primärkeimbildung zu wirken, die bis zu zwei Größenordnungen langsamer ist als beim Wildtyp. Die Sekundärkeimbildung unterscheidet sich im Gegensatz nur deutlich geringer von derjenigen des Wildtyps: Die Geschwindigkeitskonstante  $kkk2$  ist mit  $kkk2=0.036\pm 0.001 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  bei 37 ° nur um einen Faktor zwei langsamer als die des Wildtyps, bei Raumtemperatur unterscheidet sie sich mit  $kkk2=0.023\pm 0.001 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  kaum.

Die Geschwindigkeitskonstanten  $kkk1$  und  $kkk2$  steigen beide bei allen drei Varianten mit zunehmender Temperatur - einzige Ausnahme ist hier ggf.  $kkk2$  bei A $\beta$ 40E22P. *Kramers* [158] theoretischen Überlegungen folgend konnte für A $\beta$ 42WT sowohl für die Geschwindigkeitskonstante der Elongation  $k_+$  als auch für diejenigen von Primär- und Sekundärkeimbildung, d.h.  $k_{01}$  und  $k_{02}$ , ein Arrhenius-Verhalten aus temperaturabhängigen ThT Assays abgeleitet werden [138]. Dabei zeigten  $k_+$  und  $k_{01}$  einen starken Anstieg mit zunehmender Temperatur, wohingegen  $k_{02}$  nur schwach von der Temperatur abhing [138]. Davon ausgehend, dass A $\beta$ 40 ein ähnliches Temperaturverhalten zeigt und auch für dieses Peptid eine Arrhenius-Abhängigkeit von der Temperatur angenommen werden kann, könnte man für die kombinierten Geschwindigkeitskonstanten  $kkk1$  und  $kkk2$  demnach ebenfalls einen Anstieg mit zunehmender Temperatur erwarten, der für  $kkk1$  tendenziell stärker ausgeprägt wäre. Dies entspricht auch dem hier beobachteten Verhalten. Bei A $\beta$ 40WT zeigt allerdings  $kkk2$  eine stärkere Temperaturabhängigkeit als  $kkk1$ . Ob die Temperaturabhängigkeit tatsächlich einem Arrhenius-Verhalten entspricht, kann nicht überprüft werden, da zu jedem Peptid nur bei zwei unterschiedlichen Temperaturen Assays aufgenommen wurden und die Höhe der Aktivierungsenergie unbekannt ist.

Aus den bisherigen Resultaten ergibt sich damit folgendes Bild des Aggregationsverhalten von A $\beta$ 40 im Bereich mittlerer Konzentrationen, in dem sich Halbzzeit und initiale Monomerkonzentration umgekehrt proportional zueinander verhalten: Grundsätzlich aggregiert A $\beta$ 40 mittels eines amyloid-begünstigenden Dimers als Primärkeim, ggf. mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch ausgehend von einem strukturierten Monomer. Diese Wahrscheinlichkeit kann durch eine Mutation an der 22. Stelle erhöht werden. Ist das  $\beta$ -Dimer - entweder aufgrund von äußeren Bedingungen wie der Temperatur oder aufgrund einer Prolin-Mutation - jedoch nicht stabil genug, um Startpunkt der raschen Fibrillierung zu sein, wird die Keimbildungsbarriere hin zu größeren Oligomeren verschoben: Dann bilden Trimere oder Tetramere den Ausgangspunkt des Fibrillenwachstums.

Die Varianten unterscheiden sich sowohl in Primär- als auch Sekundärkeimbildungsrate. Letztere liegt aber zumindest in der gleichen Größenordnung und unterscheidet sich um maximal einen Faktor zwei bezogen auf den Wildtyp bzw. um einen Faktor vier zwischen E22P- und G37P-Variante. Die Primärkeimbildungsrate differiert hingegen um 1-2 Größenordnungen. Das heißt: Die Sekundärkeimbildung dominiert als schnellerer Prozess die Aggregation; wesentliche Unterschiede zwischen den Varianten konnten jedoch vor allem hinsichtlich des primären Keimbildungspfads beobachtet werden.

Was aber passiert in den Konzentrationsbereichen, in denen sich die Halbwertszeit und andere makroskopische Zeitkonstanten atypisch in Bezug auf die initiale Monomerkonzentration verhalten?

## 5.5. Analyse der Aggregationskinetiken im Bereich hoher und niedriger Konzentrationen

### 5.5.1. Selbst-Inhibition und Off-Pathway-Oligomere als mögliche Mechanismen bei hohen A $\beta$ 40-Konzentrationen

Im Bereich hoher Konzentrationen geht der Abfall der Halbwertszeit mit zunehmender initialer Monomerkonzentration für A $\beta$ 40WT in eine Sättigung oder gar einen Anstieg über; letzteres kann auch für die A $\beta$ E22P-Variante beobachtet werden. Aus der Literatur ergeben sich die bereits in 5.3 genannten vier Erklärungsansätze:

1. eine Sättigung der Keimbildung, möglicherweise in Form eines Michaelis-Menton-ähnlichen Sekundärmechanismus [55]
2. das Auftreten konkurrierender Oligomere, die nicht oder nur geringfügig zur Fibrillenbildung beitragen, aber die effektiv zur Verfügung stehende Monomerkonzentration reduzieren, nicht jedoch aktiv die Fibrillenbildung behindern [57, 142]
3. eine Selbst-Inhibition der Elongation in Form eines Capping-Prozess [141]
4. eine Inhibition der Sekundärkeimbildung durch parallel entstehende globuläre Oligomere und krummlinige Protofibrillen, die erst oberhalb einer kritischen Konzentration entstehen und durch Bindung an Fibrillenoberflächen die für die Sekundärkeimbildung zur Verfügung stehenden Oberflächen reduzieren [144]

Das letztgenannte Szenario wurde von *Hasecke et al.* [144] als Erklärung für den Anstieg der Halbwertszeiten bei A $\beta$ 40 postuliert.

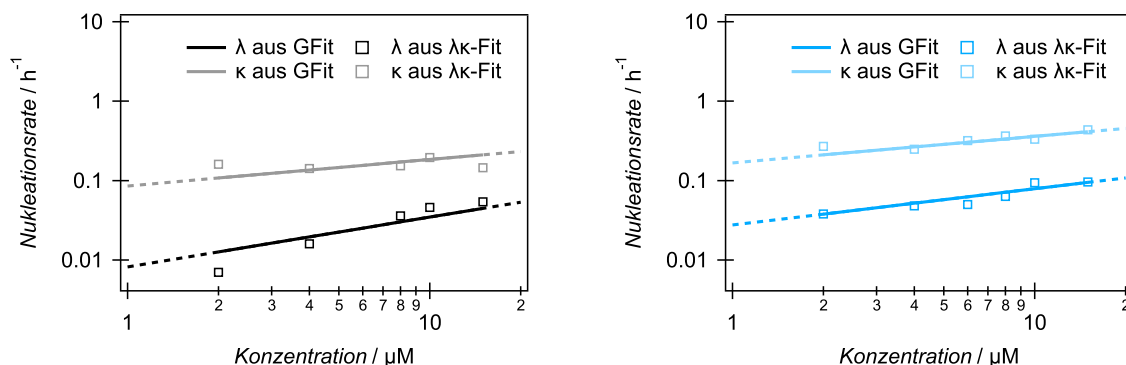


Abbildung 5.20.: **Vergleich individueller Fits gemäß Glg. 3.53 mit den Resultaten eines globalen Fits** Hier gezeigt am Beispiel von A $\beta$ 40WT (links) und A $\beta$ 40E22P (rechts) bei 37 °C. Als durchgezogene Linie sind die Resultate für  $\lambda$  und  $\kappa$  aus den globalen Fits sichtbar. Die gestrichelte Linie zeigt die Projektion für Konzentrationen außerhalb des Fitbereichs. Die offenen Symbole ergeben sich aus den individuellen  $\lambda\kappa$ -Fits und liegen entlang der Ergebnislinie des globalen Fits. Im Bereich der Gültigkeit des globalen Fits sind damit beide Ergebnisse vergleichbar.

Mittels der Gleichung 3.53 beschriebene Funktion, die nur noch von den Parametern  $\lambda$  und  $\kappa$  abhängt, die den gesamten Prozess der Fibrillenentstehung aus Primär- bzw. Sekundärkeimbildung beschreiben, soll nun untersucht werden, welcher Teil des Aggregationsprozesses im Bereich hoher Konzentrationen beeinträchtigt wird. Im von *Meisl et al.* skizzierten Szenario der Michaelis-Menton-ähnlichen Sättigung ist z.B. nur die Sekundärkeimbildung betroffen [55], sodass sich hier

die Konzentrationsabhängigkeit von  $\kappa$  verändern sollte, nicht aber die von  $\lambda$ . Auch bei der von *Hasecke et al.* [144] vorgeschlagenen Inhibition der Sekundärkeimbildung wäre ebendiese vorrangig beeinträchtigt, allerdings hätte die effektive Reduktion der freien Monomere durch konkurrierend entstehende Oligomere und Protofibrillen ggf. zusätzlich einen Effekt auf die Primärkeimbildung. Im Gegensatz dazu behindert das von *Ziaunys et al.* beschriebene Capping die Elongation durch Monomeraddition und würde sich damit auf beide Parameter auswirken[141]. Auch die Entstehung konkurrierender Oligomere würde aufgrund der Reduktion der effektiven Konzentration die Konzentrationsabhängigkeit beider Parameter verändern.

Passt man die in Gleichung 3.53 gegebene Funktion in dem Konzentrationsbereich, in dem der globale Fit Gültigkeit hat, einzeln an die entsprechenden Mittelwert-Assays an, erhält man für  $\lambda$  und  $\kappa$  Werte, die mit denen aus dem globalen Fit vergleichbar sind (s. Abb. 5.20). Damit scheint es zulässig, diese individuellen Fits auch oberhalb des für den globalen Fit ausgewählten Konzentrationsbereichs zu verwenden. Die entsprechenden ThT Assays inklusive Funktionsanpassung gemäß Gleichung 3.53 sind in Abbildung 5.21 dargestellt. In der folgenden Diskussion wird der Konzentrationsbereich, in dem der globale Fit gemäß Gleichung 3.46 angewandt werden kann, als mittlerer Konzentrationsbereich  $M$  bezeichnet, der darüber liegende Konzentrationsbereich hingegen als hoher Konzentrationsbereich  $H$ .

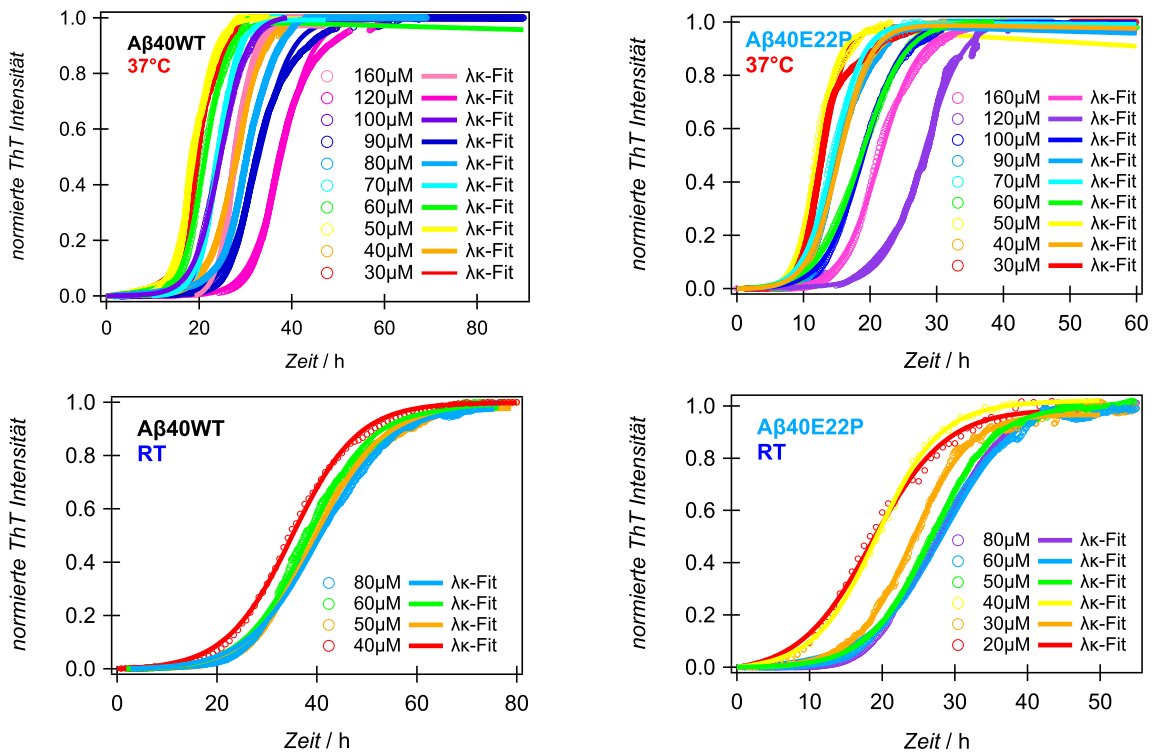


Abbildung 5.21.: **Individuelle Fits im Bereich hoher Konzentrationen** Dargestellt sind jeweils die aus mindestens drei Assays berechneten Mittelwert-Assays und das Resultat des  $\lambda\kappa$ -Fits. Trotz einzelner Ausreißer ist hier auch deutlich die Verlangsamung der Aggregation mit zunehmender Konzentration sichtbar, die sich bereits aus der Darstellung der makroskopischen Zeitgrößen ergab.

Daraus resultieren die in den Abb. 5.22 und 5.23 dargestellten Werte für  $\lambda$  und  $\kappa$ . An sie wurden - unabhängig voneinander in den Konzentrationsbereichen  $M$  und  $H$  - Potenzfunktionen der Form  $y = Ax^\gamma$  angepasst. Im mittleren Konzentrationsbereich  $M$  kann aus dem Exponenten über den in den Gleichungen 3.47 und 3.48 genannten Zusammenhang die kritische Keimgröße für primäre und sekundäre Keimbildung bestimmt werden. Bei Raumtemperatur erhält man  $n_{c1} = 1.6 \pm 0.5$  und  $n_{c2} = 0.3 \pm 0.4$  für den Wildtyp und  $n_{c1} = 3.4 \pm 0.9$  und  $n_{c2} = 0.3 \pm 0.4$  für die E22P-Variante; die Größen der Primärkeime stimmen also mit denjenigen, die sich aus dem globalen Fit ergeben

überein (vgl. Abschnitt 5.4). Lediglich der Sekundärkeim für die E22P-Variante ist hier etwas kleiner. Bei 37 °C ist hingegen der Primärkeim des Wildtyps mit  $n_{c1} = 2.6 \pm 0.4$  etwas größer als im Vergleich zu den Ergebnissen der globalen Anpassung, bei der  $n_{c1} \approx 1.9$  war. Für die E22P-Variante ergibt sich mit  $n_{c1} = 1.7 \pm 0.2$  wie bereits durch den globalen Fit ein Monomer bis Dimer (vgl. Abschnitt 5.4). Für die Sekundärkeime erhält man jeweils übereinstimmend mit den Resultaten der globalen Anpassung einen Wert von ungefähr null.

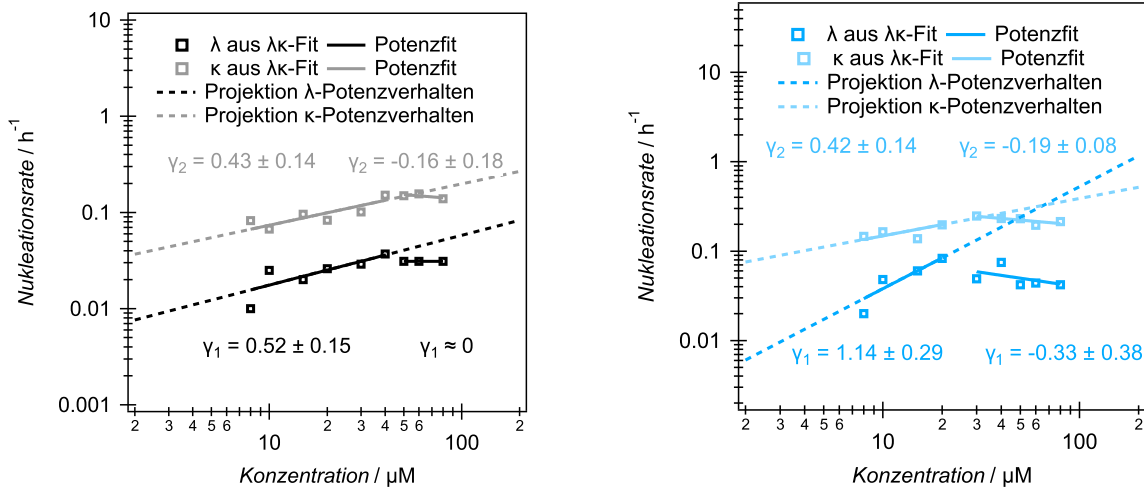


Abbildung 5.22.: **Verhalten von  $\lambda$  und  $\kappa$  im Bereich hoher Konzentrationen bei Raumtemperatur** Die Resultate, die sich aus den individuellen Fits gemäß Glg. 3.53 in Abb. 5.21 für A $\beta$ 40WT (links, in Grautönen) und A $\beta$ 40E22P (rechts, in Blautönen) ergeben, sind als offene Symbole dargestellt. An die Daten wurden Potenzfunktionen der Form  $y = Ax^\gamma$  angepasst (durchgezogene Linie). Daraus ergeben sich folgende kritische Keimgrößen:  $n_{c1} \approx 1.6$  und  $n_{c2} \approx 0.3$  für den Wildtyp und  $n_{c1} \approx 3.4$  und  $n_{c2} \approx 0.3$  für die E22P-Variante. Der Potenzfit im niedrigeren Konzentrationsbereich  $M$  wurde auf den gesamten Konzentrationsbereich projiziert (gestrichelte Linie), um die Abweichungen für  $\lambda$  und  $\kappa$  im Bereich  $H$  zu veranschaulichen.

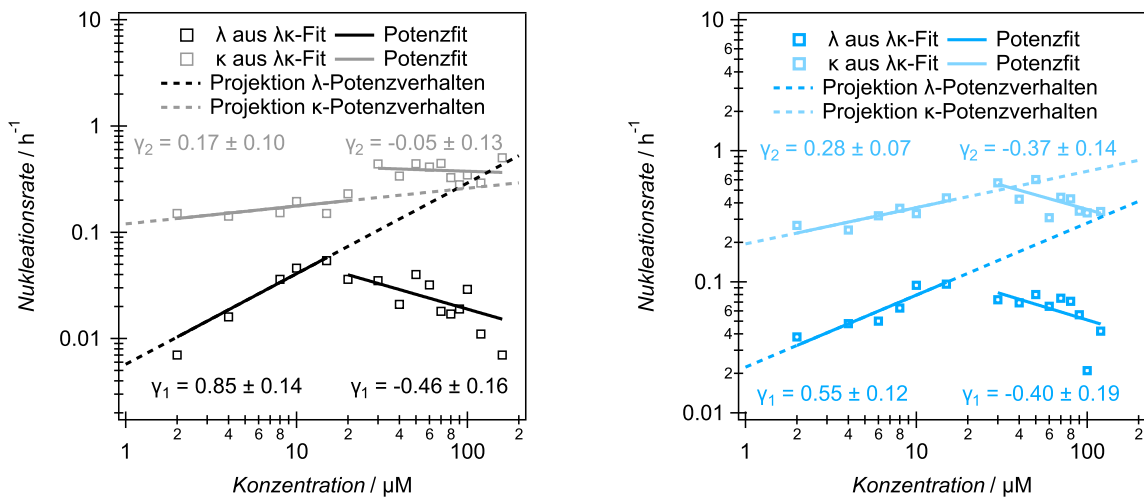


Abbildung 5.23.: **Verhalten von  $\lambda$  und  $\kappa$  im Bereich hoher Konzentrationen bei 37 °C** Die Resultate, die sich aus den individuellen Fits gemäß Glg. 3.53 in Abb. 5.21 für A $\beta$ 40WT (links, in Grautönen) und A $\beta$ 40E22P (rechts, in Blautönen) ergeben, sind als offene Symbole dargestellt. An die Daten wurden Potenzfunktionen der Form  $y = Ax^\gamma$  angepasst (durchgezogene Linie). Daraus ergeben sich folgende kritische Keimgrößen:  $n_{c1} \approx 2.6$  und  $n_{c2} \approx 0$  für den Wildtyp und  $n_{c1} \approx 1.7$  und  $n_{c2} \approx 0$  für die E22P-Variante. Der Potenzfit im niedrigeren Konzentrationsbereich  $M$  wurde auf den gesamten Konzentrationsbereich projiziert (gestrichelte Linie), um die Abweichungen für  $\lambda$  und  $\kappa$  im Bereich  $H$  zu veranschaulichen.

Im hohen Konzentrationsbereich kann hingegen die Abweichung des Aggregationsverhalten ebenfalls durch eine Potenzfunktion erfasst werden. Interessanterweise liegt die Sekundärkeimbildungsrates  $\kappa$  bei der jeweils niedrigsten Konzentration im Bereich  $H$  bei allen Fällen außer dem Wildtyp bei  $37^\circ\text{C}$  noch auf der Projektionslinie der Potenzfunktion für den Konzentrationsbereich  $M$ . Die Halbwertszeit  $t_{50}$ , deren Übergang in eine Sättigung oder einen Anstieg als Kriterium zur Unterscheidung der Konzentrationsbereiche  $M$  und  $H$  gewählt wurde, verschiebt sich demzufolge, sobald einer der beiden Keimbildungsprozesse - hier die Primärkeimbildung - sich verändert.

Beim Wildtyp gehen bei Raumtemperatur sowohl Primär- als auch Sekundärprozesse in eine Sättigung über. Bei A $\beta$ 40E22P hingegen fallen bei Raumtemperatur beide Nukleationsraten ab.

Bei  $37^\circ\text{C}$  zeigt demgegenüber der Primärkeimbildungspfad des Wildtyps mit  $\gamma_1 = -0.57 \pm 0.23$  einen deutlichen Abfall oberhalb von  $20\ \mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu springt  $\kappa$  bei etwa  $30\ \mu\text{M}$  zu etwas höheren Werten und geht dann in eine Sättigung über. Für A $\beta$ 40E22P kann wie bereits bei Raumtemperatur ein Abfall beider Nukleationsraten beobachtet werden; bei  $37^\circ\text{C}$  besitzen beide Abfälle unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen den gleichen Exponenten.

Welche Mechanismen könnten hinter diesen Beobachtungen stecken? Der Übergang beider Nukleationsraten bei Raumtemperatur in eine Sättigung könnte durch das Auftreten konkurrierender Oligomere, die nicht oder nur geringfügig zur Fibrillenbildung beitragen, erklärt werden, da in diesem Fall beide Keimbildungspfade durch die Reduktion der effektiven Monomerkonzentration limitiert würden. Auch der Capping-Effekt wirkt sich auf beide Raten aus und wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit.

Zu keinem der eingangs genannten Effekte passt das Verhalten des Wildtyps bei  $37^\circ$ , da hier die primäre Keimbildung mit zunehmender Konzentration inhibiert wird, während gleichzeitig die Sekundärkeimbildungsrates zunächst sprunghaft ansteigt und dann konstant bleibt. Die Konzentration von  $30\ \mu\text{M}$ , bei der die Sekundärkeimbildung sprunghaft ansteigt, entspricht genau der kritischen Oligomerkonzentration, die *Hasecke et al.* [144] nennen für die Bildung von Oligomeren und krummlinigen Protofibrillen, welche die Sekundärkeimbildung durch Besetzen von Wechselwirkungsflächen an der Fibrilloberfläche hemmen. Allerdings müsste, damit dieser Effekt auch hier vorliegt, die Geschwindigkeitskonstante  $\kappa$  geringer werden. Die hier gezeigten Daten zeigen zudem eine Inhibition der Primärkeimbildung, die in dem von *Hasecke et al.* genannten Szenario nicht vorkommt.

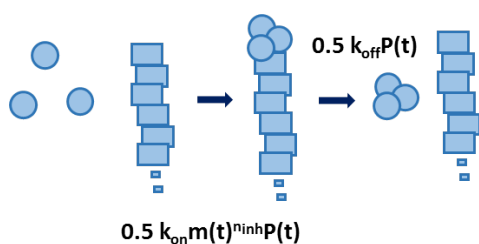


Abbildung 5.24.: **Selbst-Inhibition durch Capping** An einem Fibrillende entsteht ein Oligomer, wodurch das Ende nicht für die Elongation durch Monomeraddition zur Verfügung steht, bis das Oligomer dissoziiert.

Das zumindest eine Sättigung der Primärkeimbildung für A $\beta$ 40 nicht unwahrscheinlich ist, zeigt eine Re-Evaluation der eingangs genannten Daten von *Meisl et al.* [55], die demonstrierte, dass zusätzlich zu der damals angenommenen Sättigung der Sekundärkeimbildung auch eine Sättigung der Primärkeimbildung vorliegen muss [159].

Im Fall von A $\beta$ 40E22P fallen sowohl bei Raumtemperatur als auch bei  $37^\circ\text{C}$  beide Nukleationsraten ab. Das spricht dafür, dass in diesem Fall beide Mechanismen eingeschränkt werden. Die Generation von konkurrierenden Oligomeren, die nicht oder nur geringfügig zur Fibrillenbildung

Auffällig ist auch, dass zwar die Primärkeimbildungsrates abfällt, nicht aber gleichzeitig die Sekundärkeimbildung betroffen ist. Eine Einschränkung der Konformationsänderung zu  $\beta$ -Faltblatt begünstigenden Strukturen könnte diesen Effekt erklären, da diese Konformationsänderung bei der Sekundärkeimbildung vermutlich durch die als Schablone wirkende Fibrille begünstigt wird. Allerdings ist unklar, wie eine erhöhte initiale Monomerkonzentration zu einer Behinderung der Konformationsänderung führt: Möglicherweise bilden sich bei hohen initialen Monomerkonzentrationen Oligomere, die größer sind als die bei  $10\ \mu\text{M}$  beobachteten Dimere (vgl. Abb. 5.14 oder [105]) und bei denen die Konformationsänderung hin zu einer amyloid-begünstigenden Struktur langsamer

beitragen, ohne sie jedoch aktiv zu stören, würde die effektive Monomerkonzentration senken und würde sich sowohl auf  $\lambda$  als auch  $\kappa$  auswirken. Allerdings wäre in diesem Fall vermutlich lediglich eine Sättigung beobachtbar. Beim von *Ziaunys et al.* [141] beschriebenen Capping-Effekt wird zusätzlich die Elongation durch Monomeraddition inhibiert (vgl. Abb. 5.24); eine solche Inhibition würde sich - wie hier beobachtet - auf beide Keimbildungsraten auswirken und erscheint deshalb für A $\beta$ 40E22P als das wahrscheinlichste der genannten Szenarien.

In das Modell von *Dear et al.* [26] und *Michaels et al.* [27] lässt sich der Capping-Effekt einarbeiten, indem eine neue Geschwindigkeitskonstante  $k_{inh}$  eingeführt wird, welche die Generation von inhibierend wirkenden Oligomeren am Fibrillenende und deren Trennung von der Fibrille beschreibt:

$$k_{inh} = 0.5 (k_{off} - k_{on}m(t)^{n_{inh}}) P(t) =: \sigma P(t) \quad (5.1)$$

Dabei stellt  $P(t)$  die zeitabhängige Zahlenkonzentration der Fibrillen dar,  $k_{on}$  und  $k_{off}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten, mit denen sich am Fibrillenende ein Oligomer bildet oder löst, und  $m(t)$  gibt die Konzentration freier Monomere an. Die Zahl  $n_{inh}$  steht für die kritische Keimgröße des inhibierend wirkenden Oligomers. Den Faktor 0.5 wird verwendet, da nur eins der beiden Fibrillenenden betrachtet wird. Der Prozess ist in Abbildung 5.24 dargestellt. Durch ihn wird das Gleichungssystem 2.36, das die Aggregation eines Amyloids durch Elongation, Primär- und Sekundärkeimbildung inkl. einer möglichen Konformationsänderung von Oligomeren beschreibt, erweitert zu

$$\begin{pmatrix} \frac{dS_0(t)}{dt} \\ \frac{dP_0(t)}{dt} \\ \frac{dM_0(t)}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\rho_e & 0 & \alpha_2 \\ \rho_c & \sigma & 0 \\ 0 & \mu & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ P_0(t) \\ M_0(t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.2)$$

Sowohl bei dem als Möglichkeit für die Inhibition der Primärkeimbildung skizzierten Szenario als auch beim Capping-Effekt spielen Oligomere eine wichtige Rolle. Wie groß aber sind die Oligomere, die bei hohen Konzentrationen sowohl bei A $\beta$ 40WT als auch A $\beta$ 40E22P entstehen? Einen

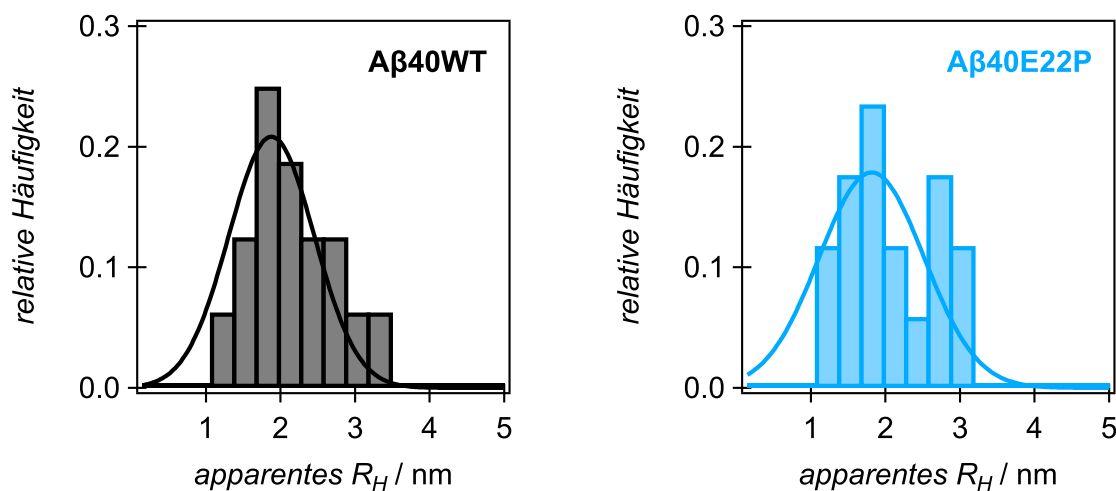


Abbildung 5.25.: Größenverteilung der beobachteten hydrodynamischen Radii während des Aggregationsprozesses An bei einer Konzentration von  $40 \mu\text{M}$  und einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  nach dem *pH13-Protokoll* inkubierte A $\beta$ 40WT- und A $\beta$ 40E22P-Lösungen wurden alle zwei Stunden smFS-Messungen aufgenommen und für jede dieser Messungen mittels FCS der apparente hydrodynamische Radius möglicher in der Lösung befindlicher Oligomere bestimmt. Das Maximum der Häufigkeit des Auftretens liegt für A $\beta$ 40WT bei  $R_H=1.9$  nm und für A $\beta$ 40E22P bei  $R_H=1.8$  nm.

Hinweis hierauf kann die Auswertung von Aggregationsreihen mittels smFS liefern. A $\beta$ 40WT- bzw. A $\beta$ 40E22P-Lösungen mit einer Konzentration von  $40 \mu\text{M}$  wurden gemäß dem *pH13-Protokoll* inku-



biert, wobei sie so mit Atto488-A $\beta$ 40WT bzw. Atto488-A $\beta$ 40E22P versetzt wurden, dass die Konzentration gelabelter A $\beta$ -Peptide etwa 60 pM betrug. Während des Aggregationsprozesses wurden alle zwei Stunden einige Mikroliter der fibrillierenden Lösung für eine smFS-Messung abgenommen. Abb. 5.25 zeigt die Größenverteilungen der apparenten hydrodynamischen Radii, die sich durch FCS-Auswertung der erhaltenen Messungen ergeben. Am häufigsten konnte für A $\beta$ 40WT ein apparenter hydrodynamischer Radius von  $R_H=1.9$  nm gemessen werden und für A $\beta$ 40E22P einer von  $R_H=1.8$  nm. Unter der Annahme globulärer Oligomere und einem hydrodynamischen Radius von 1.1 nm im Fall eines Monomers (vgl. Abb. 5.14) entspräche dies Tetra- bis Pentameren. Im Gegensatz dazu wurden bei 10  $\mu$ M, d.h. im Konzentrationsbereich  $M$ , für A $\beta$ 40WT hauptsächlich Dimere beobachtet (vgl. Abb. 5.14 oder [105]). Damit könnte das hier gezeigte Ergebnis die These stützen, dass sich im Konzentrationsbereich  $H$  größere Oligomere mit verlangsamter Konformationsänderung bilden. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass durch die FCS-Auswertung keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es sich um Oligomere, die Bestandteil der Primärkeimbildung sind, durch Capping entstandene Oligomere oder andere Aggregate handelt.

### 5.5.2. Wandeffekte bei niedrigen A $\beta$ 40-Konzentrationen

Bei Raumtemperatur variieren Lag- und Halbzzeit sowohl beim Wildtyp als auch der E22P-Variante bei niedrigen Konzentrationen unterhalb von 6-8  $\mu$ M stark. Das führt dazu, dass die makroskopischen Zeitkonstanten in diesem Konzentrationsbereich weder mit zunehmender Konzentration abfallen noch steigen (vgl. Abb. 5.17). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten, besteht darin, dass hier - nahe der kritischen Monomerkonzentration der Fibrillierung - Effekte an den Gefäßwänden der Mikrotiterplatten stärker zum Tragen kommen, die durch die Verwendung von *non-binding*-Mikrotiterplatten zwar minimiert wurden, aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden können (vgl. Kap. 5.2). Solche Wandeffekte wären auch bei höheren Konzentrationen oder Temperaturen vorhanden, hier aber im Vergleich zu anderen, dominierenden Aggregationsprozessen vernachlässigbar. Abb. 5.26 zeigt mögliche Wandeffekte während der A $\beta$ -Aggregation.

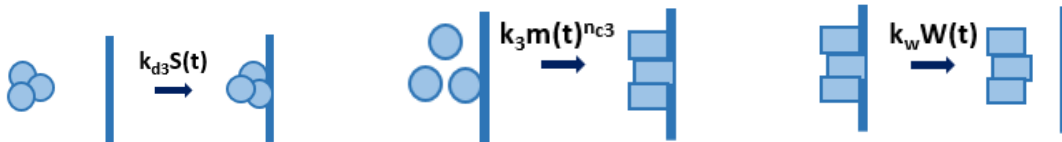


Abbildung 5.26.: **Mögliche Wandeffekte während der A $\beta$ -Aggregation** An den Gefäßwänden der Mikrotiterplatten, in denen die A $\beta$ 40-Lösungen inkubiert werden, sind verschiedene Wandeffekte denkbar: Eine Adsorption globulärer Oligomere (links), die dadurch nicht mehr dem Aggregationsprozess zur Verfügung stehen, heterogene Keimbildung (Mitte) und dass an der Wand entstandene amyloid-begünstigend-strukturierte Keime in Lösung übergehen (rechts), wodurch sie zur Aggregation beitragen können. Zusätzlich ist auch ein Verbleib von Fibrillen an den Wänden denkbar.

Zum einen könnten in der Lösung vorhandene Oligomere mit einer Rate  $k_{ad,wall}$ , definiert durch

$$k_{ad,wall} = k_{d3}S(t) =: \rho_w S(t) \quad (5.3)$$

von der Wand adsorbiert werden, wobei  $k_{d3}$  die Geschwindigkeitskonstante der Adsorption ist und  $S(t)$  die zeitabhängige Konzentration der Oligomere in der Aggregationslösung. Durch diesen Effekt würde die Zahl in Lösung vorhandener Oligomere reduziert.

Zweitens könnte durch Interaktionen von Monomeren an der Gefäßwand heterogene Keimbildung stattfinden, die in Analogie zur Primärkeimbildung über eine heterogene Keimbildungsrate

$$k_{het} = k_3 m(t)^{n_3} =: \alpha_3 \quad (5.4)$$

beschrieben werden kann.

Außerdem könnten kritische Keime, die sich an der Wand gebildet haben, sich mit einer Geschwindigkeitskonstante

$$k_{wall} = k_w W(t) =: \omega W(t) \tag{5.5}$$

von dieser lösen.  $W(t)$  bezeichnet dabei die zeitabhängige Konzentration der adsorbierten Oligomere, die für diesen Prozess zur Verfügung stehen.

Das bereits zu Gleichung 5.2 erweiterte Differentialgleichungssystem zur Beschreibung der A $\beta$ -Aggregation würde unter Berücksichtigung all dieser Prozesse nochmals ergänzt zu

$$\begin{pmatrix} \frac{dS_0(t)}{dt} \\ \frac{dW_0(t)}{dt} \\ \frac{dP_0(t)}{dt} \\ \frac{dM_0(t)}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\rho_e & 0 & 0 & \alpha_2 \\ \rho_w & -\omega & 0 & 0 \\ \rho_c & \omega & \sigma & 0 \\ 0 & \mu & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ W_0(t) \\ P_0(t) \\ M_0(t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \alpha_3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{5.6}$$

### 5.6. Resultierendes Modell der A $\beta$ 40-Aggregation

Die bisherigen Ergebnisse führen zum in Abbildung 5.27 dargestellten Bild der A $\beta$ 40-Aggregation: Der primäre Aggregationspfad des A $\beta$ 40-Peptids unter den hier gewählten Bedingungen besteht aus der schnellen Zusammenlagerung von Monomeren zu Dimeren und der anschließenden Koformati- onsänderung hin zu einem Fibrillenbildung begünstigenden Dimer, wobei zweiteres vermutlich der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist (grau). Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit - die durch eine Mutation an der 22. Stelle erhöht wird - ist zudem eine Monomerkonversion als Startpunkt der Fibrillenbildung möglich (blau). Ist das  $\beta$ -Dimer aufgrund äußerer Bedingungen oder Mutationen wie der an der 37. Stelle nicht stabil genug, bilden stattdessen Trimere oder Tetramere den Ausgangspunkt des Fibrillenwachstums (rot). Durch Primärkeimbildung entstandene Fibrillen dienen als Oberfläche der Sekundärkeimbildung. Sie verläuft entweder mittels Monomerkonversion an der Fibrillenoberfläche oder möglicherweise mit der Fibrillenoberfläche selbst als Keim oder „Schablon- ne“ für neue Fibrillen (violett).

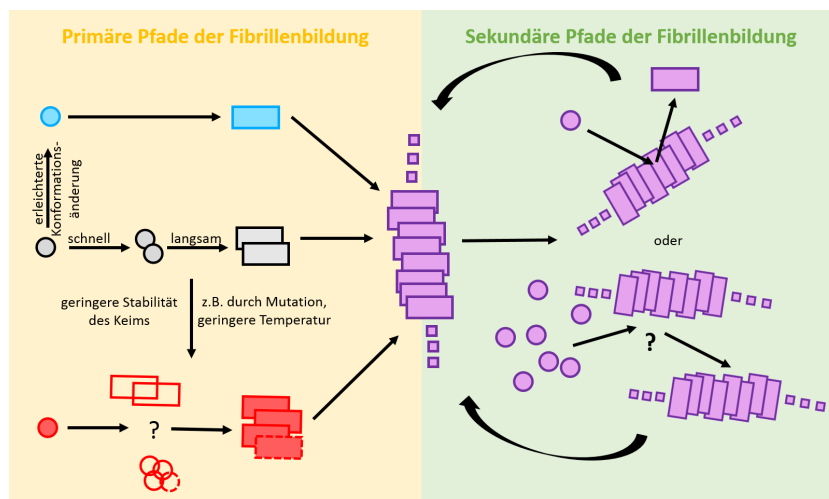


Abbildung 5.27.: **Modell der A $\beta$ 40-Aggregation** Der primäre Hauptaggregationspfad verläuft mittels einer Dimerisierung (grau). Ebenso ist auch eine Monomerkonversion als Startpunkt der Fibrillenbildung möglich (blau). Ist das fibrilläre Dimer nicht stabil genug, sind Trimere oder Tetramere der Primärkeim (rot). Die so entstandenen Fibrillen dienen als Wechselwirkungsfläche für die Sekundärkeimbildung (violett). Für die Sekundärkeimbildung wurde eine Keimgröße zwischen null und etwa eins beobachtet. Letzteres entspricht einer Monomerkonversion an der Fibrillenoberfläche als Startpunkt der Fibrillenbildung (oben). Bei  $n_{c2}=0$  hingegen ist der genaue Mechanismus an der Fibrillenoberfläche unklar (unten).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Prolin-Mutationen wirken sich damit vor allem auf die Primärkeimbildung aus. Dies spiegelt sich auch in den Geschwindigkeitskonstanten  $kkk1$  und  $kkk2$  wider: Erstere unterscheiden sich deutlich stärker (s. Abschnitt 5.4).

Während bei geringen Konzentrationen von weniger als  $6\text{-}8\ \mu\text{M}$  vermutlich Wandeffekte zu einer verringerten Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Konzentration führen, kann bei hohen Konzentrationen oberhalb von  $15\text{-}30\ \mu\text{M}$  ein Sättigungs- bzw. Inhibitionseffekt beobachtet werden, der allerdings nicht bei A $\beta$ 40G37P auftritt. Dabei wird nicht nur die Sekundärkeimbildung gehemmt, sondern auch oder sogar hauptsächlich die Primärkeimbildung. Für den ersten Fall einer Behinderung von Primär- und Sekundärkeimbildung könnten nicht oder nur geringfügig zur Fibrillenbildung beitragende Oligomere oder - wahrscheinlicher - ein Capping-Effekt verantwortlich sein. Zusätzlich müssen jedoch weitere Mechanismen vorliegen, die den zweiten Fall der dominierenden Inhibition der Primärkeimbildung erklären.

## 5.7. Vergleich mit A $\beta$ 42

Abschließend sollen zum Vergleich die auch Aggregationskinetiken von A $\beta$ 42WT und den Varianten E22P und G37P kurz untersucht werden. Legt man die von *Wälti et al.* [68] vorgelegte Fibrillenstruktur des A $\beta$ 42-Wildtyps zugrunde, befinden sich die Mutationen bei A $\beta$ 42 nahezu spiegelverkehrt an den beiden Übergängen zwischen äußerem  $\beta$ -Strang und Schleife zum inneren  $\beta$ -Strang (vgl. Abb. 5.28).

Prolin-Variationen von A $\beta$ 42 wurden bereits zum Zweck der Strukturanalyse *Morimoto et al.* untersucht. Dabei beobachteten sie einzig für die E22P-Variante eine beschleunigte Aggregation und eine geringere kritische Monomerkonzentration von  $C_r = 0.4\ \mu\text{M}$  im Vergleich zum Wildtyp ( $C_r = 0.9\ \mu\text{M}$ ); zudem zeigte A $\beta$ 42E22P eine deutlich erhöhte Neurotoxizität. Für A $\beta$ 42G37P konnte hingegen innerhalb des untersuchten Zeitraums keine Fibrillenbildung beobachtet werden. [137].

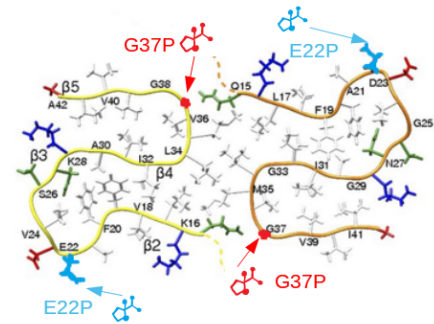


Abbildung 5.28.: **A $\beta$ 42-Struktur mit eingezeichneten Mutationen E22P und G37P** Die Stellen, an denen Glutaminsäure durch Prolin ersetzt wurde (E22P), sind blau eingezeichnet. Dort, wo Prolin gegen Glycin eingetauscht wurde (G37P), erscheint eine rote Markierung. Adaptiert von [68].

### 5.7.1. Aggregationskinetik der verwendeten A $\beta$ 42-Varianten

Da es hier um einen Vergleich von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 hinsichtlich Primär- und Sekundärkeimbildung, nicht aber um ggf. vorhandene Zusatzeffekte wie Capping oder Oberflächeneffekte gehen soll, wurde ein kleinerer Messbereich gewählt: Gezeigt werden Aggregationskinetiken bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Konzentrationsbereich von  $4\ \mu\text{M}$  bis  $40\ \mu\text{M}$ . Wie bereits für A $\beta$ 40 wurden bei jeder Konzentration mindestens drei Assays aufgenommen. Dabei konnte - im Gegensatz zu *Morimoto et al.* - auch für die G37P-Variante zuverlässig die Fibrillierung beobachtet werden. Die E22P-Variante fibrillierte zu schnell für eine fundierte Analyse (s. Abb. B.10 in Anhang B.6), sodass die Auswertung sich auf den Wildtyp und die G37P-Variante beschränkt.

Bei Auftragung der Halbwertszeit gegen die Konzentration zeigen beide Varianten einen Abfall mit einer Potenz von  $\gamma \approx -0.5$  (vgl. Abb. 5.29). Dies könnte ein erstes Indiz dafür sein, dass nicht etwa ein kritischer Keim bestehend aus zwei bis vier Monomeren wie bei den untersuchten A $\beta$ 40-Varianten, sondern eine Konformationsänderung eines Monomers hin zu einem thermodynamisch stabilen, eine  $\beta$ -Faltblatt-begünstigenden Struktur Ausgangspunkt der A $\beta$ 42-Aggregation ist. Die Möglichkeit einer solchen Konformationsänderung wurde bereits experimentell via NMR und mittels MD-Simulationen beschrieben [160, 161]. Interessanterweise zeigt die G37P-Variante, bei der für A $\beta$ 40 über einen großen Konzentrationsbereich keine Veränderung des zugrunde liegenden Ag-

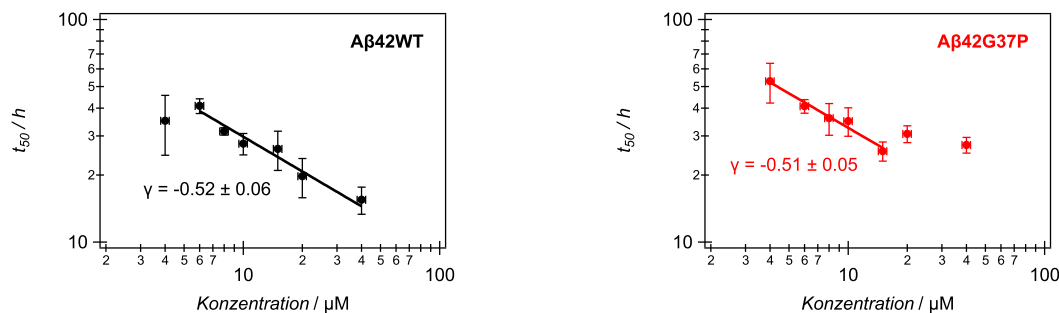


Abbildung 5.29.: **Konzentrationsabhängigkeit der Halbwertszeit von A $\beta$ 42-Varianten bei 37 °C** Eingezeichnet ist zusätzlich das Resultat der Anpassung eines Potenzgesetzes und die erhaltene Potenz  $\gamma$ .

gregationsprozesses beobachtbar war, oberhalb von 15  $\mu\text{M}$  bereits einen Übergang in eine Sättigung.

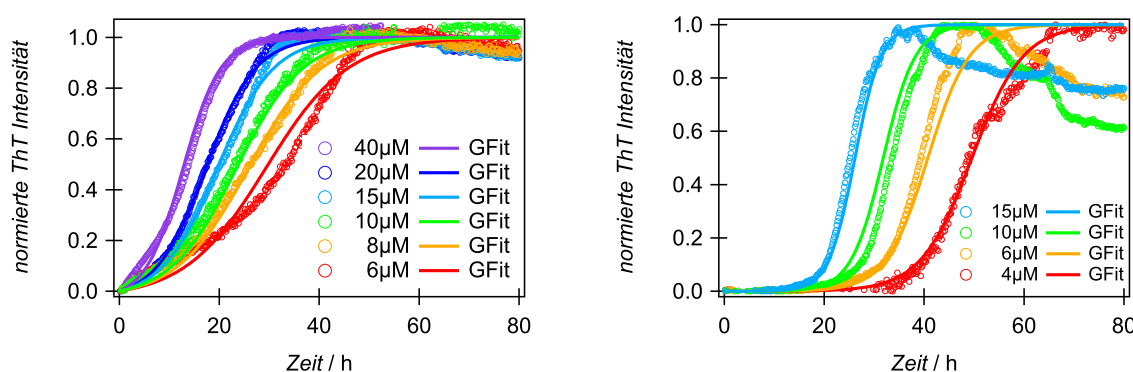


Abbildung 5.30.: **Globaler Fit an den A $\beta$ 42-Varianten bei 37 °C** Dargestellt sind die aus jeweils mindestens drei Assays errechneten Mittelwert-Assays (offene Symbole) und das Resultat des globalen Fits (Linien).

Abb. 5.30 zeigt die Mittelwert-Assays, die sich aus den nach Gleichung 3.39 normierten Assays ergeben, und die Funktionsanpassung gemäß Gleichung 3.46 in den Konzentrationsbereichen ohne Sättigung. Das Resultat des globalen Fits (vgl. 5.4) bestätigt die Annahme einer Restrukturierung des Monomers als Ausgangspunkt der Aggregation: Die Reaktionsordnungen von Primär- und Sekundärkeimbildung liegen bei  $n_{c1} = 1.34 \pm 0.02$  und  $n_{c2} = 0.22 \pm 0.05$  für den Wildtyp bzw.  $n_{c1} = 1.29 \pm 0.43$  und  $n_{c2} = 0.52 \pm 0.19$  für die G37P-Variante.

Variante	$n_{c1}$	$n_{c2}$	$kkk1 / \mu\text{M}^{-n_{c1}/3}\text{h}^{-1}$	$kkk2 / \mu\text{M}^{-(n_{c2}+1)/3}\text{h}^{-1}$
A $\beta$ 42WT	$1.34 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.05$	$0.019 \pm 0.001$	$0.047 \pm 0.002$
A $\beta$ 42G37P	$1.29 \pm 0.43$	$0.52 \pm 0.19$	$0.005 \pm 0.001$	$0.077 \pm 0.009$

Tabelle 5.4.: **Übersicht der Nukleationskenngrößen bei 37 °C** Ergebnisse resultierend aus globalen Fits an Konzentrationsserien aus mindestens 3 ThT Assays je Konzentration.

Die Geschwindigkeitskonstante der Primärkeimbildung ist für A $\beta$ 42WT mit  $kkk1 = 0.019 \pm 0.001 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  etwa dreimal so groß wie bei A $\beta$ 40WT und ca. vervierfacht gegenüber der A $\beta$ 42G37P-Variante mit einer Geschwindigkeitskonstante  $kkk1 = 0.005 \pm 0.001 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu erscheint die Geschwindigkeitskonstante der Sekundärkeimbildung mit  $kkk2 = 0.047 \pm 0.002 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  sogar geringer als für A $\beta$ 40WT und A $\beta$ 42G37P, das mit  $kkk2 = 0.077 \pm 0.009 \mu\text{M}^{-1/3}\text{h}^{-1}$  eine etwa doppelt so hohe Geschwindigkeitskonstante hat wie die entsprechende A $\beta$ 40-Variante.

## 5.8. Zusammenfassung und Fazit

Die Keimbildungsprozesse während der Fibrillenbildung lassen sich durch die Aufnahme von Aggregationskinetiken bei unterschiedlichen Konzentrationen untersuchen. Dafür wurde ein Präparations- und Inkubationsprotokoll etabliert, bei dem sowohl für A $\beta$ 40 als auch A $\beta$ 42 möglichst nur vermittels Primär- und Sekundärkeimbildung Fibrillen gebildet werden und andere Prozesse wie z.B. Fragmentierung vernachlässigbar sind.

Eine Auswertung des konzentrationsabhängigen Abfalls von Halbzeit und Lagzeit ergab ebenso wie eine Analyse nach dem Modell von *Dovidchenko et al.* [62] und eine globale Funktionsanpassung gemäß der Oligomere berücksichtigenden aktuellen Modelle von *Knowles, Linse* und *Dobson* [26, 27], dass A $\beta$ 40 als Primärkeim wahrscheinlich ein Dimer bildet. Dieses Resultat passt gut zu bisherigen Ergebnissen in der Literatur (s. bspw. [55, 149]), die sich allerdings auf rekombinantes A $\beta$ 40 bezogen, während hier synthetisches A $\beta$  verwendet wurde, das langsamer fibrilliert [69]. FCS-Messungen stützen die Annahme eines Dimers als Primärkeim und legen zudem nahe, dass A $\beta$ 40 bei pH 7.5 rasch globuläre Dimere bildet und die anschließende Konformationsänderung hin zu einem amyloid-begünstigenden Dimer der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Fibrillenbildung via Primärkeimbildung ist. Sie zeigen zudem, dass die aus den *a priori* verwendeten Modellannahmen gewonnenen Größen eine tatsächliche experimentelle Entsprechung haben. Für die Sekundärkeimbildung wurde je nach gewählter Analyse eine Reaktionsordnung zwischen null und eins bestimmt, was dafür spricht, dass die Sekundärkeimbildung entweder durch die Konformationsänderung eines Monomers eingeleitet wird oder eine bereits existierende Fibrille selbst als Keim fungiert.

Bei Konzentrationen oberhalb von 20  $\mu$ M wurde bei 37 °C zudem ein Inhibitionseffekt sichtbar, der zu diesem Zeitpunkt für A $\beta$ 40 noch nie beobachtet worden war, inzwischen aber auch von *Hasecke et al.* [144] beschrieben wurde. Ein solcher Inhibitionseffekt bei hohen Konzentrationen konnte auch für A $\beta$ 40E22P beobachtet werden; hier kann er ggf. durch einen Capping-Effekt [141] erklärt werden. Eine fehlende Konzentrationsabhängigkeit der Halbzeit bei geringen Konzentrationen bei Raumtemperatur hingegen könnte auf Wandeffekte zurückzuführen sein.

Der Austausch einer Aminosäure durch Prolin führte im Fall der Variante A $\beta$ 40E22P wie auch bei anderen Varianten mit einer Mutation an der 22. Stelle zu einer beschleunigten Aggregation. Sowohl die Geschwindigkeitskonstante der Primärkeimbildung als auch der Sekundärkeimbildung war erhöht, resultierend in kürzeren Lag- und Halbzeiten. Bei der Variante A $\beta$ 40G37P zeigte sich der gegenteilige Effekt. Insbesondere die Geschwindigkeitskonstante der Primärkeimbildung war hier deutlich niedriger. Die Auswertung der Aggregationskinetiken mittels derselben globalen Analyse wie für A $\beta$ 40WT zeigte, dass sich die Größe des Primärkeims durch die Prolin-Mutation sowohl in Richtung eines Monomers als auch hin zu Tri- bis Tetrameren verschieben kann. Letzteres scheint dann der Fall zu sein, wenn ein Dimer aufgrund geringerer Temperaturen oder einer inhibierend wirkenden Mutation wie G37P nicht ausreichend stabil ist, um den kritischen Keim zu bilden.

Bei A $\beta$ 42 scheint die Konformationsänderung eines Monomers hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt begünstigenden Konformation den Startpunkt sowohl des primären als auch des sekundären Fibrillierungsprozesses zu bilden. Ein solches Verhalten zeigt auch die Prolin-Variante A $\beta$ 42G37P. Eine solche Konformationsänderung wurde für A $\beta$ 42 auch mittels NMR und MD-Simulationen nachgewiesen [160, 161]. Interessanterweise war die Geschwindigkeitskonstante der Sekundärkeimbildung für A $\beta$ 42 sogar geringer als für A $\beta$ 40, wohingegen die Geschwindigkeitskonstante der Primärkeimbildung etwa dreimal so groß war.

Damit unterscheiden sich die verschiedenen A $\beta$ -Varianten vor allem hinsichtlich der Primärkeimbildung mit unterschiedlichen Keimgrößen und um bis zu zwei Größenordnungen verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten. Auch die Sekundärkeimbildung differierte hinsichtlich der Geschwindigkeitskonstanten, die jedoch alle in der gleichen Größenordnung lagen, nicht aber hinsichtlich der Reaktionsordnung, die mit Ausnahme von von A $\beta$ 40E22P bei Raumtemperatur immer zwischen null und eins lag. Der sekundäre Fibrillierungspfad ähnelte sich damit bei allen Varianten.



# 6. Flüssigkeits-FDSC-Untersuchungen der Thermostabilität des A $\beta$ 42-Peptids

## 6.1. Einleitung und Fragestellung

Zur Untersuchung diverser thermisch induzierbarer Prozesse und temperaturabhängiger Größen hat sich die Dynamische Differenz-Kalorimetrie etabliert. Sie ermöglicht beispielsweise die Charakterisierung von Denaturierungsprozessen und der thermischen Stabilität von Proteinen [162, 163], die Ermittlung der Bindungsenergien von Proteinen [164], die Bestimmung der Wärmekapazität beliebiger Flüssigkeiten [165] oder die Untersuchung der Schmelz-, Kristallisations- und Glasübergänge von Polymeren [107]. Dabei beschränkt sich die konventionelle DSC aufgrund technischer Limitierungen auf Heizraten von maximal einigen zehn Kelvin pro Minute.

Die Entwicklung von DSC-Sensoren mit zwei Membranen, welche die Funktion von Proben- und Referenzkammer konventioneller DSCs übernehmen, ermöglicht demgegenüber Heizraten von einigen zehntausend Kelvin pro Sekunde [108, 166]. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, schnelle Reorganisationsprozesse und Nicht-Gleichgewichtszustände zu untersuchen, deren Beobachtung der Standard-DSC aufgrund zu geringerer Scanraten verschlossen bleibt. Beispielsweise konnte von *Cebe et al.* nachgewiesen werden, dass die  $\beta$ -Faltblatt-Kristalle, aus denen Seidenfasern bestehen, in trockenem Zustand schmelzen, d.h. in eine ungeordnete (*random coil*-) Konformation übergehen - bei langsameren Scanraten kommt es zur thermischen Zerstörung der Makromoleküle, ehe ein solcher Schmelzvorgang beobachtet werden kann [167]. Zunächst konnte die Schnelle Dynamische Differenz-Kalorimetrie (FDSC) allerdings nur auf feste Proben angewandt werden; erst 2015 wurden von *Splinter et al.* Sensoren eingeführt, die auch die Analyse von Flüssigkeiten ermöglichen und damit das Studium wässriger Proteinlösungen [30].

Mit dieser Arbeit sollen nun zuerst die Flüssigkeits-FDSC in der Fachgruppe etabliert und die Flüssigkeitssensoren [109] bezüglich verfügbarem Messbereich und Sensitivität charakterisiert werden (s. Kap. 6.2). Aus Hühnereiweiß hergestelltes Lysozym dient dabei als Testprobe, da es in großen Mengen günstig verfügbar ist und seine thermischen Eigenschaften umfassend erforscht und wohlbekannt sind (vgl. bspw. [168]).

Anschließend wird die Flüssigkeits-FDSC genutzt, um die Thermostabilität von Aggregaten des A $\beta$ 42-Peptids in Lösung zu untersuchen (s. Kap. 6.3). Während die durch hohe Temperaturen induzierte Entfaltung nativer Proteine in Lösung umfassend studiert wurde, existieren kaum Arbeiten, die sich mit der thermischen Auflösung amyloider Strukturen beschäftigen - als Ausnahme sei hier z.B. die Untersuchung der thermischen Entfaltung der Fibrillen der SH3-Mutante N47A von *Morel et al.* genannt [29]. Da bei der Flüssigkeits-FDSC mit Sensoren nur geringe Probenmengen benötigt werden und die Messdauer von wenigen Sekunden eine fortlaufende Aggregation während der Messung verhindert, besteht insbesondere die Hoffnung, auch Oligomere oder andere Intermediate, die während des Aggregationsprozesses nur gering populiert sind, untersuchen zu können.

Die im Folgenden gezeigten Daten wurden im Rahmen zweier als Bestandteil dieser Arbeit konzeptionierten und betreuten Bachelorarbeiten [169, 170] aufgenommen und für dieses Kapitel neu zusammengestellt und diskutiert.

## 6.2. Etablierung und Charakterisierung von Flüssigkeitssensoren

Da noch keine eigenen Messstandards für den Umgang mit Flüssigkeitssensoren im Flash DSC existierten, sondern sie erst mit dieser Arbeit etabliert wurden, wurden DSC-Messungen an einer wässrigen 0.35 wt%-Lysozymlösung mit einer Heizrate von 60 K/h in einem Standard-DSC durchgeführt - als Referenz für die Messungen im Flash DSC. Um den Einfluss einer möglichen Asymmetrie zwischen Proben- und Referenzkammer zu eliminieren, wurde bei diesen Messungen eine Wassermessung abgezogen und zusätzlich eine Basislinie substrahiert, um nur noch das Signal darzustellen. Daraus ergeben sich eine Heiz- und Kühlkurve wie in Abbildung 6.1 dargestellt.

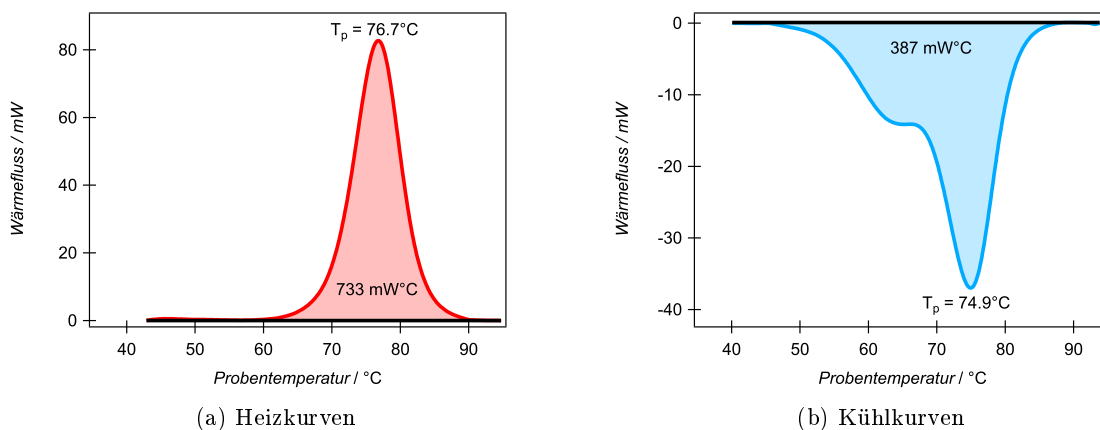


Abbildung 6.1.: **Basislinien-korrigierte DSC-Messung an einer 0.35 wt%-Lysozymlösung mit einer Scanrate von 60 K/h** Die Heizkurve zeigt einen Denaturierungsübergang bei 76.7°C mit einer spezifischen Übergangsenthalpie von  $25.4 \pm 0.3$  J/g. Die in der Kühlkurve beobachtete Rückfaltung ist jedoch - trotz der sehr langsamen Messung - nicht vollständig, was sich in den unterschiedlichen Flächeninhalten des Signals niederschlägt; zudem ist in der Flanke des Rückfaltungssignals ein weiterer Peak zu sehen. Eine Ursache hierfür können Aggregationsprozesse während der Messung sein.

Die Heizkurve zeigt ein klares Signal bei 76.7°C, das auf die thermische Entfaltung des Lysozyms zurückgeführt werden kann. Aus dem Flächeninhalt des Signals von  $733 \pm 8$  mW°C ergibt sich über die Probenkonzentration  $c$ , die Heizrate  $\beta$  und das beheizte Volumen  $V$  der DSC-Kammern von 0.51 ml eine spezifische Enthalpie

$$H_{spez} = \frac{A}{\beta m} = \frac{A}{\beta c V} \quad (6.1)$$

von  $25.4 \pm 0.3$  J/g. Der Fehler bei der Bestimmung des Flächeninhalts wurde mit 1% abgeschätzt. Bei einer vollständigen Rückfaltung sollte die Übergangsenthalpie für Ent- und Rückfaltung identisch sein, die Signalfäche für Heiz- und Kühlkurve also gleich groß. Dies ist jedoch nicht der Fall; zusätzlich enthält das Rückfaltungssignal einen weiteren Peak (vgl. Abb. 6.1b). Das spricht dafür, dass während der aufgrund der geringen Scanrate sehr langen DSC-Messung Aggregationsprozesse stattgefunden haben, die auch dadurch begünstigt werden, dass sie im Gegensatz zur endothermen Denaturierungsreaktion exotherm sind [162].

Um die FDSC-Messungen mit Flüssigkeitssensoren zu etablieren, wurde in einem ersten Schritt der verfügbare Messbereich charakterisiert. Enthalten Proben- und Referenzkammer beide nur das Lösungsmittel, ist ein lineares Verhalten der Heiz- und Kühlkurven zu erwarten, da jegliche thermische Prozesse in beiden Kammern gleichzeitig stattfinden. Beschränkt sich der Messbereich auf eine Temperaturspanne, in der keine Wechsel des Aggregatzustands zu erwarten sind, gilt dies umso mehr. Deshalb wurden zunächst Heiz- und Kühlratenvariationen mit einem beidseitig mit Wasser gefüllten Sensor aufgenommen (vgl. Abb. 6.2). Bei den Heizkurven ist im niedrigen Temperaturbereich knapp oberhalb der Starttemperatur von 25°C zunächst eine Schwingung zu beobachten, die auf eine Einstellungsregulation des Flash DSCs zurückgeht. Sie ist fast zu vernachlässigen bei einer



## 6.2. ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON FLÜSSIGKEITSENSOREN

Heizraten von 100 K/s, wird mit zunehmender Heizrate immer ausgeprägter und deckt schließlich bei 500 K/s den Temperaturbereich bis etwa 50 °C ab. Oberhalb dieser Regulationsschwingung erhält man jedoch einen linearen Bereich, der für die Aufnahme von Messsignalen geeignet ist.

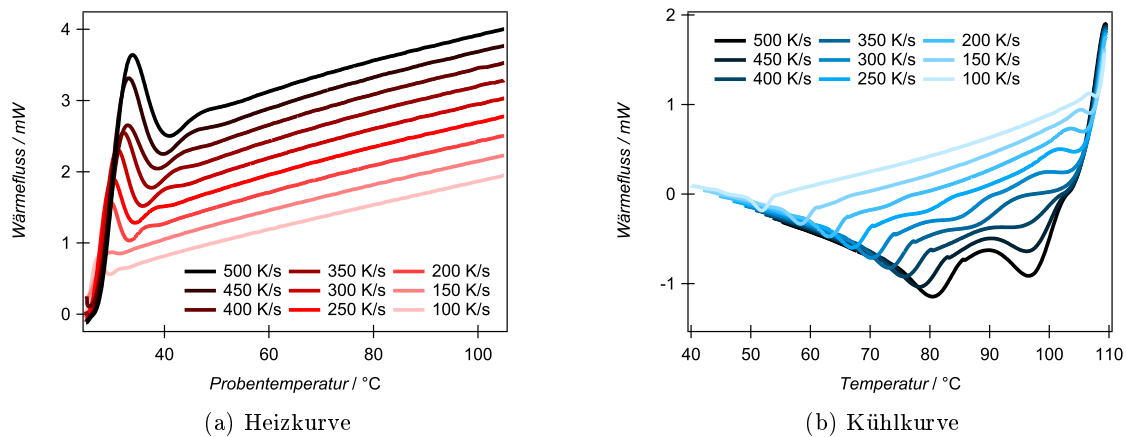


Abbildung 6.2.: **Heiz- und Kühlratenvariation an einem beidseitig mit Wasser gefüllten Flüssigkeitssensor** Die Heizkurven zeigen über einen weiten Temperaturbereich einen linearen Verlauf. Der niedrige Temperaturbereich ist jedoch durch eine Regulationsschwingung des Flash DSCs eingeschränkt, die umso ausgeprägter ist, je größer die gewählte Heizrate ist. Im Gegensatz dazu lässt sich bei den Kühlkurven nur bei Kühlraten von bis 200 K/s ein linearer Bereich finden; bei höheren Temperaturen genügt die Kühlung durch die Umgebungstemperatur nicht, um das gewünschte Kühlverhalten zu erzeugen.

Anders sieht es bei Kühlkurven aus: Da das Flash DSC nur gegen die Umgebungstemperatur kühlt - im Fall dieser Messung 25 °C - kann es bei hohen Kühlraten nicht schnell genug die gewünschten Temperaturen erreichen und versucht dementsprechend stark nach zu regulieren, was in nicht-lineare Kurven resultiert. Lediglich bei Kühlraten bis maximal 200 K/s zeigt sich ein Abschnitt linearen Temperaturverhaltens, in dem Messsignale aufgenommen werden könnten.

Um das Einschwingungssignal hin zu niedrigeren Temperaturen zu verschieben, wurde auch - an einer Puffermessung, die aber die gleiche Funktion erfüllt wie die oben gezeigten Wassermessungen - versucht, die Umgebungstemperatur über den an das Flash DSC angeschlossenen Intracooler herabzusetzen und so einen größeren Temperaturbereich zu erschließen. Dabei konnte nur bis zu einer minimalen Umgebungstemperatur von 10 °C gearbeitet werden, weil unterhalb dessen bei Einstellungsschwingungen der Gefrierpunkt unterschritten und damit der Sensor zerstört werden kann. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.3 zu sehen - es zeigt wie erhofft eine Erweiterung des nutzbaren Temperaturbereichs um etwa 10 °C.

Die obere Grenze des nutzbaren Temperaturbereichs wurde dadurch definiert, dass ein Sensor mit 400 K/s bewusst auf 200 °C aufgeheizt und damit zerstört wurde. Wie in Abbildung 6.4 zu erkennen, lassen sich damit vier verschiedene Bereiche definieren:

1. die bereits bekannte Regulationsschwingung im niedrigen Temperaturbereich
2. einen linearen Messbereich
3. einen kritischen Bereich zwischen ca.  $T_S = 140$  °C und  $T_S = 160$  °C, in dem die Sensormembran thermisch stark beansprucht wird
4. den Temperaturbereich oberhalb von etwa  $T_S = 160$  °C, in dem der Sensor irreversibel zerstört ist und kein verwertbares Messsignal mehr liefert

Damit liegt der für Messungen zugängliche Temperaturbereich zwischen ca. 40 °C und 140 °C.

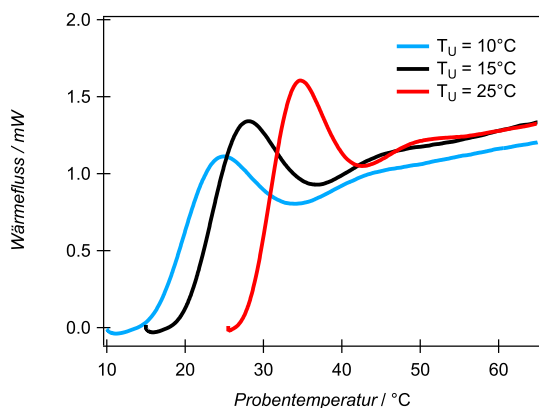


Abbildung 6.3.: **Variation der Umgebungstemperatur für Heizkurven** Für einen beidseitig mit demselben Natriumphosphatpuffer befüllten Sensor wurde die Umgebungstemperatur variiert, von der aus der Heizprozess startet. Das Ende der Regulationsschwingung zu Beginn der Messung verschiebt sich dadurch für eine Heizrate von 400 K/s von ca. 58 °C bei der Standardumgebungstemperatur  $T_U = 25^\circ\text{C}$  auf nur ca. 44 °C bei einer Umgebungstemperatur von  $T_U = 10^\circ\text{C}$ .

Um die Sensitivität der Sensoren zu definieren, wurden konzentrationsabhängige Messungen an Lysozym durchgeführt und der Konzentrationsbereich eingegrenzt, in dem sich das Messsignal noch auflösen lässt. Bei der Auswertung der Messsignale ist im Gegensatz zum konventionellen DSC der Abzug einer Referenzmessung beim Flash DSC unüblich: Da die aktive Fläche nur einen kleinen Teil der gesamten Sensormembran ausmacht, aber die gesamte Sensorfläche von der Flüssigkeit bedeckt wird, wird die Wärmekapazität der Membran stark von der Probe bzw. dem Lösungsmittel beeinflusst, sodass sich die Wärmekapazität der Membran und der Probe kaum voneinander unterscheiden [171].

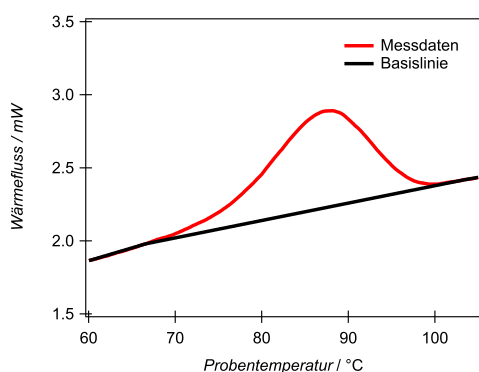


Abbildung 6.5.: **Bestimmung der Basislinie** An die Steigung vor und nach dem Messsignal wird jeweils eine Tangente angelegt, die über eine dritte Gerade miteinander verbunden sind. Diese drei Geraden bilden zusammen die Basislinie, die für weitere Auswertungen abgezogen wird.

sowohl von Vergleichswerten in der Literatur als auch dem eigenen Referenzwert aus der in Abb. 6.1 dargestellten Lysozymmessung waren.

Um aus dem Flächeninhalt der Messsignale eine spezifische Enthalpie zu berechnen, wird gemäß

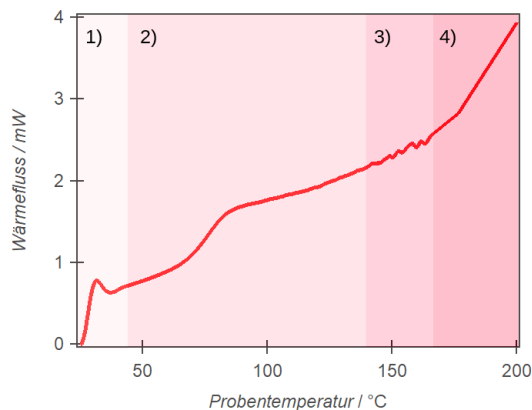


Abbildung 6.4.: **Grenzen des Messbereichs der Sensoren** Mit 400 K/s wurde ein mit A $\beta$ 2-Fibrillen befüllter Sensor auf 200 °C aufgeheizt. Es lassen sich im Verlauf der Heizkurve vier Bereiche unterscheiden: 1) Bereich mit Regulationsschwingungen 2) für Messungen geeigneter Bereich mit Messsignal 3) kritischer Bereich mit stark beanspruchter Membran 4) Bereich, in dem der Sensor zerstört und unbrauchbar ist

Der typische Verlauf einer Heizkurve, die an einer wässrigen Lysozym-Lösung aufgenommen wurde, ist in Abb. 6.5 dargestellt. Vor und nach dem Entfaltungsübergang wird der Wärmefluss durch die Wärmekapazität des nativen bzw. entfalten Zustands bestimmt, der Entfaltungsübergang selbst durch ein endothermes Messsignal charakterisiert. An eine solche Messkurve kann eine Basislinie angepasst und zur Isolierung des Messsignals abgezogen werden. Dafür werden die linearen Anstiege, die den Aufwärmprozess des nativen bzw. entfalten Lysozyms widerspiegeln, durch eine Tangente beschrieben und diese beiden Tangenten im Bereich des Messsignals mittels einer weiteren Geraden verbunden. Üblich ist eigentlich die Anpassung einer Stufenfunktion als Basislinie [172]; dies hat sich jedoch für unsere Messungen als nicht praktikabel erwiesen, da die resultierenden Flächeninhalte zu klein und damit die ermittelten spezifische Enthalpien weit abweichend sowohl von Vergleichswerten in der Literatur als auch dem eigenen Referenzwert aus der in Abb. 6.1

Gleichung 6.1 entweder die Kenntnis über die Probenmasse oder die über Konzentration und beheiztes Volumen benötigt. Letzteres ist im Fall der Flüssigkeitssensoren jedoch nicht klar definiert. Vom Hersteller werden 15 nl als beheiztes Volumen angegeben [109], diese Aussage trifft aufgrund der unterschiedlichen Sensorgeometrie so pauschal jedoch nicht zu. Die Sensoren weisen keine einheitliche *Gap Size*  $h$  auf, d.h. der Abstand zwischen Sensormembran und Kunststoffabdeckung unterscheidet sich und damit auch das verfügbare Volumen über der beheizbaren aktiven Fläche. Dieses ließe sich über

$$V = \frac{\pi d^2}{4} h \quad (6.2)$$

berechnen, wobei  $d$  der Durchmesser der aktiven Fläche ist. Allerdings lässt sich das beheizte Volumen aus rein geometrischen Überlegungen wahrscheinlich nicht klar bestimmen, da davon auszugehen ist, dass ein Temperaturgradient innerhalb der Proben- bzw. Referenzflüssigkeit existiert. Statt das Volumen für die Berechnung der Enthalpie abzuschätzen, kann auch versucht werden, die Probenmasse aus der beobachteten Wärmekapazität zu bestimmen, indem der Unterschied des Wärmeflusses bzw. der entsprechenden Leistung  $\Delta P$  zwischen Heiz- und Kühlkurve gleicher Heizrate im Temperaturbereich oberhalb des Denaturierungssignals abgelesen und die Probenmasse über

$$m = \frac{\Delta P}{2c_p\beta} \quad (6.3)$$

berechnet wird. In Tabelle 6.1 werden die verschiedenen Enthalpien, die man über die Herstellerangaben für das beheizte Volumen bzw. die beiden vorgestellten Berechnungsarten erhält, anhand einer mit 100 K/s geheizten und gekühlten wässrigen Lösung mit 10 wt% Lysozym miteinander verglichen.

Berechnungsart	beheiztes Volumen <i>nl</i>	Probenmasse $\mu g$	spezifische Enthalpie $J/g$
Herstellerangabe	15	1.5	9.1
Sensor-spezifisches Volumen über der aktiven Membranfläche	7.5	0.75	18.1
Bestimmung der Probenmasse über $\Delta P$ zwischen Heiz- und Kühlkurve	1.8	0.2	75.6

Tabelle 6.1.: **Berechnung der spezifischen Enthalpie unter der Annahme verschiedener beheizter Volumina bzw. Probenmassen für eine 10 wt% Lysozymprobe** Es zeigen sich starke Unterschiede für die resultierende spezifische Enthalpie je nach Berechnung des Volumens bzw. der Masse. Selbst unter der Annahme eines großzügigen Fehler von 10 % liegt keiner der Werte im Bereich des Referenzwertes von 25.4 J/g. Das beste Ergebnis erzielt noch die Berechnung des beheizten Volumens über die Sensor-spezifische Geometrie.

Die Berechnung der spezifischen Enthalpie über die spezifische Sensor-Geometrie liefert dabei mit 18.1 J/g noch am ehesten ein Ergebnis, das zu dem im konventionellen DSC bestimmten Referenzwert von  $25.4 \pm 0.3$  J/g passt. Wirklich zufriedenstellend erscheint aber keine dieser Methoden. Für spätere Messungen am A $\beta$ -Peptid wurden deshalb Messungen mit Lysozym im selben Sensor als Referenz genommen: Die Probenmasse ergibt sich dann als Quotient aus der erwarteten spezifischen Enthalpie von Lysozym und der aus der Messung bestimmten Übergangsenthalpie.

Abbildung 6.6a) zeigt eine Konzentrationsserie von Lysozymmessungen mit 400 K/s, um die Sensitivität der Flüssigkeitssensoren zu charakterisieren. Da bei einer Konzentration von 1 mg/ml kein Denaturierungssignal mehr auflösbar ist, sollte die Probenkonzentration im Fall von Lysozym mindestens 10 mg/ml betragen. Dies entspricht einer beobachteten Übergangsenthalpie von  $2.3 \pm 0.1$   $\mu J$ .

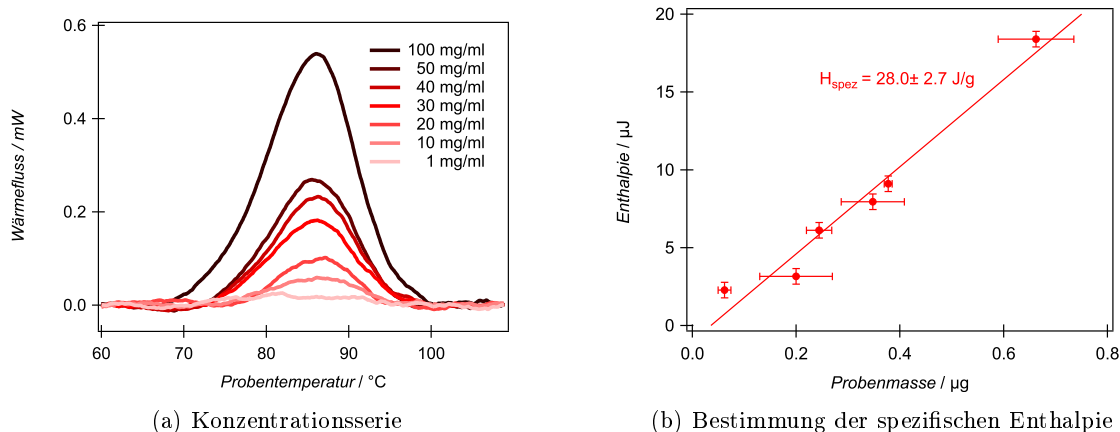


Abbildung 6.6.: **Konzentrationsserie von Heizkurven an wässrigen Lysozymbiosungen** Bei einer Konzentration von weniger als 1 mg/ml kann kein Entfaltungssignal beobachtet werden. Die Auftragung der in dieser Serie gemessenen Enthalpien gegen die Probenmasse ergibt eine spezifische Enthalpie von  $28.0 \pm 2.7 \text{ J/g}$ ; dies stimmt innerhalb des Fehlerbereichs mit den  $25.4 \pm 0.1 \text{ J/g}$ , die mittels einer äquivalenten Messung im konventionellen DSC bestimmt wurden, überein.

Bei Proben mit einer höheren oder geringeren spezifischen Übergangsenthalpie kann die Mindestkonzentration dementsprechend variieren.

Aus der Konzentrationsserie kann die spezifische Enthalpie bestimmt werden, indem man die gemessenen Enthalpien gegen die Probenmasse aufträgt und eine Gerade an die Daten anpasst. Um die Probenmasse zu berechnen, wurde die Konzentration durch das nach Gleichung 6.2 ermittelte beheizte Volumen von ca. 7.4 nl geteilt. Man erhält eine spezifische Enthalpie von  $28.0 \pm 2.7 \text{ J/g}$  und damit die gleiche Denaturierungsenthalpie wie mit der Referenzmessung im konventionellen DSC. Eine quantitative Analyse der Übergangsenthalpien ist damit trotz der Unsicherheit bezüglich des beheizten Volumens möglich, wenn ein ausreichend großer Fehler angenommen wird.

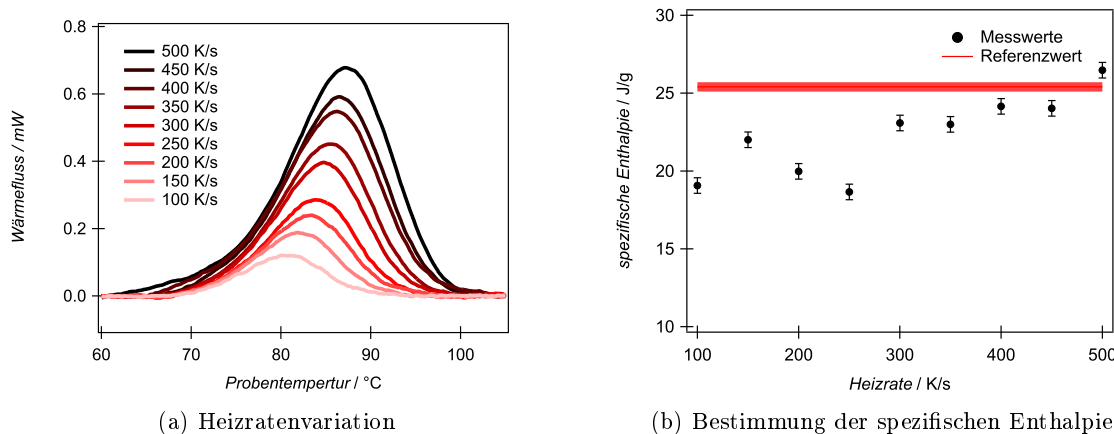


Abbildung 6.7.: **Heizkurven einer 10 wt% Lysozymbiosung und anschließende Bestimmung der spezifischen Enthalpie.** Alle getesteten Heizraten sind ausreichend zur Erzeugung eines Denaturierungssignals und zeigen die zu erwartende Verschiebung des Entfaltungssignals zu höheren Temperaturen mit ansteigender Heizrate. Die spezifische Übergangsenthalpie, die sich aus den Heizkurven ergibt, ist jedoch trotz identischer Probe und Benutzung desselben Chips jedoch nicht konstant und weicht auch vom Referenzwert im konventionellen DSC (rot eingezeichnet) ab.

Als letzter Schritt der Charakterisierung der Flüssigkeitssensoren wurden Heizkurven einer 10 wt% Lysozymbiosung unter Variation der Heizrate zwischen 100 K/s und 500 K/s aufgenommen (vgl. Abb. 6.7). Es zeigen sich mit der Heizrate größer werdende Entfaltungssignale, die unabhängig

davon jedoch die gleiche spezifische Enthalpie aufweisen sollten; stattdessen schwanken die Werte für die spezifische Enthalpie stark und werden tendenziell mit geringerer Heizrate kleiner. Da bei der Messung mehrere Heizscans hintereinander liefen, wobei die Messung mit der höchsten Heizrate zuerst stattfand, könnte es sein, dass sich das Lysozym während der Kühlscans zwischen den Messungen nicht vollständig zurückgefaltet hat.

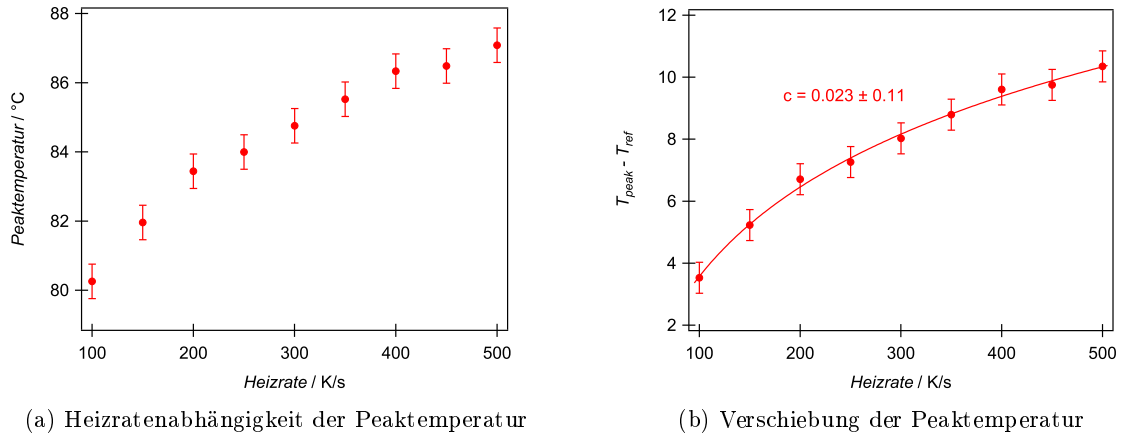


Abbildung 6.8.: **Verschiebung der Peaktemperatur in Abhängigkeit der Heizrate** Eine Heizratenabhängigkeit der Peaktemperatur gegenüber einer bei niedriger Rate gemessenen Referenztemperatur ist aufgrund des Thermal Lags bei ultraschnellen DSC-Messungen erwartbar. Als Referenztemperatur dient das Messergebnis der konventionellen DSC-Messung von Lysozym, d.h.  $T_{ref} = 76.7^\circ\text{C}$ . Eine Anpassung der Form  $\Delta T = a + b\beta^c$  zeigt allerdings, dass sich die für Lysozym beobachtete Temperaturverschiebung nicht allein durch den Thermal Lag erklären lässt, da  $c < \frac{1}{2}$  ist.

Ein zweiter Effekt einer zunehmenden Heizrate ist die Verschiebung der Peaktemperatur hin zu höheren Temperaturen (vgl. auch Abb. 6.8). Dieses Phänomen ist in der Dynamischen Differenzkalorimetrie grundsätzlich als *Thermal Lag* bekannt und auf ein Wärmeleitfähigkeitsproblem zurückzuführen: Der Sensor für die Proben­temperatur misst nicht direkt in der Probe, sondern an einer bestimmten Stelle der Sensormembran, die tatsächliche Proben­temperatur muss sich also erst durch einen entsprechenden Wärmefluss auf den Sensor übertragen. Dabei wirken sowohl Instrument-interne thermische Widerstände als auch der Temperaturgradient innerhalb der Probe ver­langsamend. Bei den hohen Heizraten der ultraschnellen DSC verzögert der im Vergleich dazu langsame Wärmefluss die Weitergabe der Proben­temperatur so, dass das Denaturierungssignal fälschlicherweise einer zu hohen Temperatur zugeordnet wird. [173]

In der Polymerphysik gilt neben dem *Thermal Lag* auch das *Superheating* (s. bspw. [174]) als mögliche Ursache für eine Verschiebung der Peaktemperatur hin zu höheren Temperaturen. Eine Unterscheidung beider Effekte kann durch Anpassen einer Funktion

$$\Delta T = T_{peak} - T_{ref} = a + b\beta^c \quad (6.4)$$

an den Heizraten-abhängigen *Thermal Lag* getroffen werden, da für  $\frac{1}{2} < c < 1$  nur von *Thermal Lag* ausgegangen werden muss, wohingegen bei  $c < \frac{1}{2}$  Superheating eine Rolle spielt. [175, 176]

Überträgt man diesen Ansatz auf die in den Abbildungen 6.7 und 6.8 dargestellte Lysozymmessung, hieße das, dass auch für diese Messung *Superheating* eine Rolle spielt, da  $c = 0.023 \pm 0.11$  ist. Allerdings existiert nach meinem Kenntnisstand keine Vorstellung dazu, was dieser Effekt im Fall einer Proteinfaltung in Lösung bedeuten würde. Ggf. könnten auch noch weitere, proteinspezifische Effekte eine Rolle spielen. Zur Abklärung dieser Effekte wären weitere experimentelle Studien notwendig, die den Rahmen der hier angestrebten Sensorcharakterisierung jedoch sprengen würden.

### 6.3. Thermostabilität von A $\beta$ 42-Aggregaten

Nach Abschluss der Methodenetablierung und Sensorcharakterisierung wurde die Thermostabilität des A $\beta$ 42-Peptids und seiner Aggregate untersucht. Da es bei einer Präparation nach dem *pH9-Protokoll* mehr und größere Oligomere bildet als A $\beta$ 40 (vgl. Kap. 4), eignet sich A $\beta$ 42 besonders, um vergleichend Monomer-, Oligomer- und Fibrillenlösungen zu untersuchen. Zu beachten bleibt jedoch, dass die Oligomerlösungen aufgrund der Heterogenität des Aggregationsprozesses auch Fibrillen enthalten und umgekehrt; es sollte unter den in Kapitel 3.5.2 genannten Präparationsbedingungen lediglich die jeweils gewünschte Spezies dominieren.

Für A $\beta$ 42-Monomere konnte kein Entfaltungsübergang beobachtet werden. Vermutlich entfalten sich die weitgehend ungeordneten Peptide entweder bei Temperaturen unterhalb der minimal zugänglichen ca. 44 °C oder sie besitzen eine so geringe spezifische Denaturierungsenthalpie, dass die Sensitivität der Sensoren nicht ausreicht, um den Entfaltungsübergang zu detektieren.

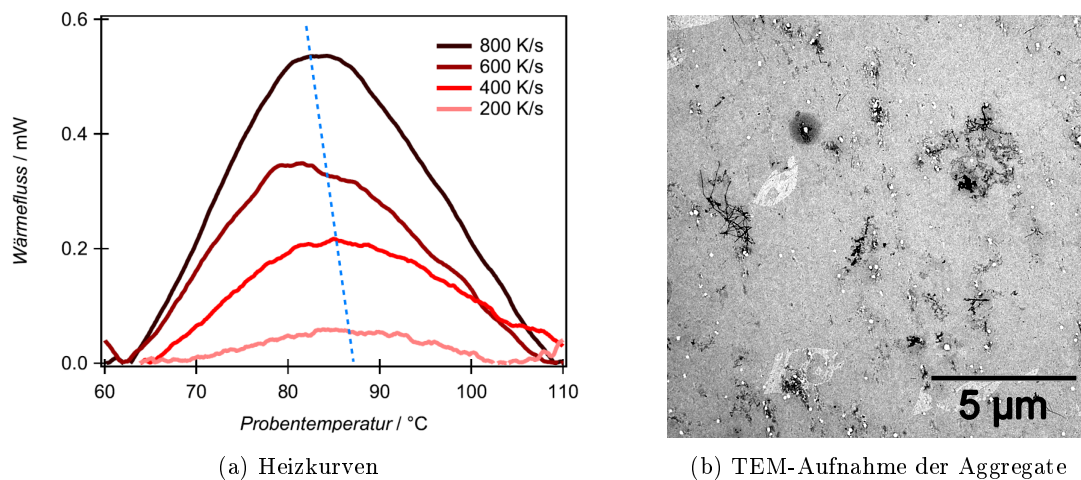


Abbildung 6.9.: **Disaggregations- bzw. Entfaltungsübergang der nach 6 h gebildeten A $\beta$ 42-Aggregate** Heizkurven an 6 h aggregierten A $\beta$ 42-Aggregaten zeigen ein klares endothermes Signal, das auf Disaggregation bzw. Entfaltung hindeutet. Auffällig ist hierbei besonders die Verschiebung der Peaktemperatur hin zu geringeren Temperaturen mit steigender Heizrate (indiziert durch die eingezeichnete blaue Linie). Sie könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei höheren Heizraten weniger stark strukturierte Aggregate entfaltet werden - sei es durch unterdrückte Teilprozesse der Entfaltung oder fehlende Reorganisationsprozesse. Auffällig ist zudem der breite Temperaturbereich des Signals, der auf einen mehrstufigen Prozess hindeutet. Die TEM-Aufnahme rechts bestätigt, dass unter den gewählten Bedingungen nebst einigen wenigen Fibrillen und Protofibrillen primär globuläre Oligomere entstehen.

Im Gegensatz dazu zeigen Oligomerlösungen reversibel und reproduzierbar einen Disaggregations- oder Entfaltungsübergang im Temperaturbereich von 70 °C bis 110 °C (vgl. Abb. 6.9). Auffällig ist hierbei die Verschiebung der Peaktemperatur hin zu geringeren Temperaturen mit steigender Heizrate, ein Verhalten, das konträr zur Erwartungshaltung aufgrund des *Thermal Lag*-Effekts läuft. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass es sich um einen mehrstufigen Prozess handelt, dessen Übergangssignale zu einem einzigen Peak verschmieren. Hohe Heizraten könnten einen oder mehrere dieser Teilprozesse blockieren, da sie zu langsam ablaufen, um sich innerhalb der vorgegebenen Zeit zu vollziehen, was in eine effektiv niedrigere Peaktemperatur resultiert. Ebenfalls möglich wäre ein mit höheren Heizraten zunehmend unterdrückter Reorganisationsprozess, bei dem teilweise disaggregierte oder entfaltete Strukturen sich wieder neu zusammenlagern, ehe sie erneut entfaltet werden, sodass sich der sichtbare endotherme Übergang bei geringeren Heizraten zu höheren Temperaturen verschiebt.

Um die Hypothese zu testen, dass es sich um einen mehrstufigen Prozess handelt, wurde ein Stufenexperiment durchgeführt (vgl. Abb. 6.10). Die Probe wurde mit je 200 K/s zunächst auf 70 °C aufgeheizt und anschließend in 10 °C-Schritten bis auf 130 °C. Für jede Temperatur wurde eine

Isotherme von 180 s bzw. 30 s Länge aufgenommen - ab 90 °C hält das Stufenprogramm die Temperatur dabei nur noch für 30 s, um die Sensor nicht zu sehr zu belasten.

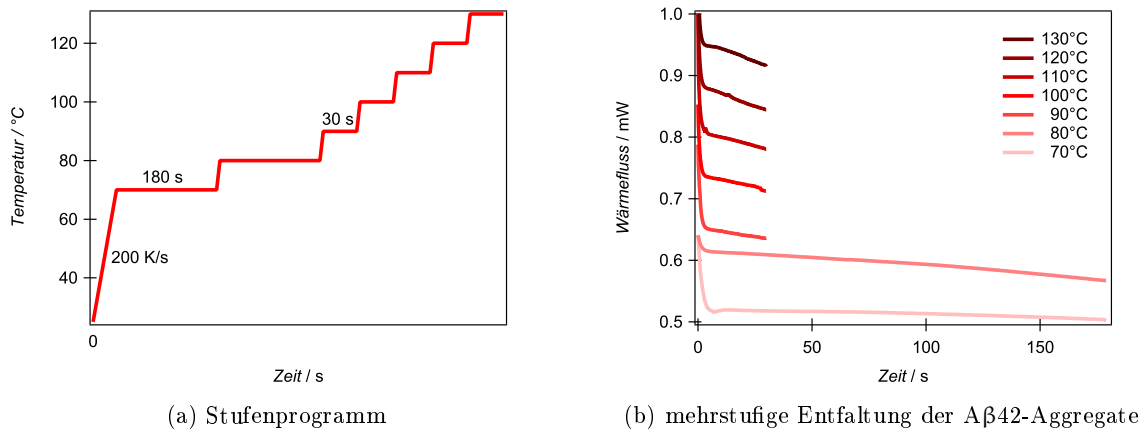


Abbildung 6.10.: **Stufenprogramm zur Auflösung einer potentiell mehrstufigen Disaggregation** Zu sehen sind rechts die während der links eingezeichneten Isothermen aufgenommenen Messungen des Wärmeflusses. Er fällt bei allen Isothermen ab, d.h. es finden im gesamten Temperaturbereich Entfaltungs- bzw. Disaggregationsprozesse statt. Dies kann entweder auf eine mehrstufige Reaktion hinweisen oder darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedlich stark strukturierte Aggregate mit entsprechend differierenden Entfaltungstemperaturen disaggregieren.

Für alle Isothermen kann ein Abfall des Wärmeflusses beobachtet werden, d.h. es finden Disaggregations- oder Entfaltungsprozesse in allen Temperaturbereichen statt. Ein mehrstufiger Prozess wäre demnach plausibel. Möglich wäre auch, dass es sich nicht um eine mehrstufige Entfaltung einer bestimmten Oligomerspezies handelt, sondern sich unterschiedliche Aggregate entfalten, die jeweils ihre eigene spezifische Übergangstemperatur besitzen.

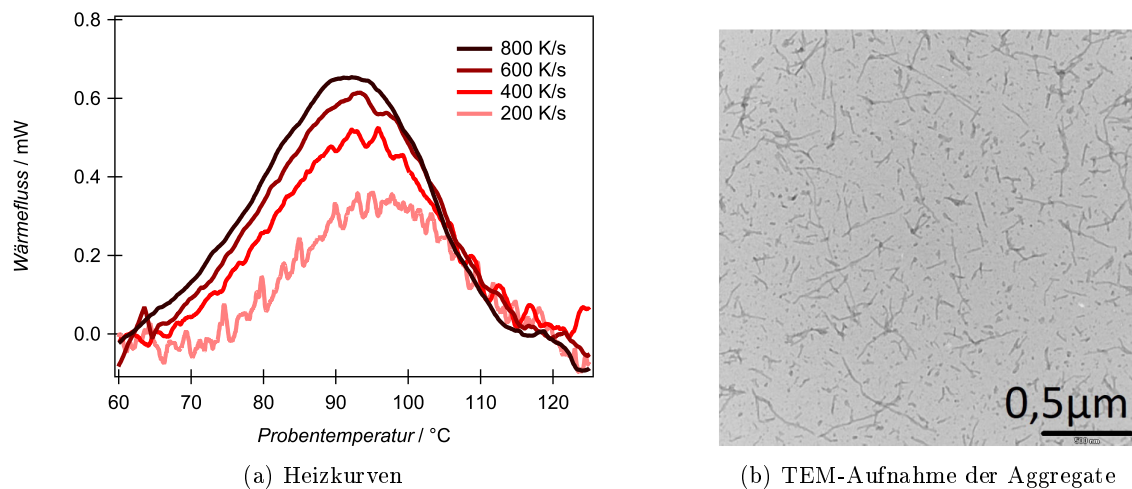
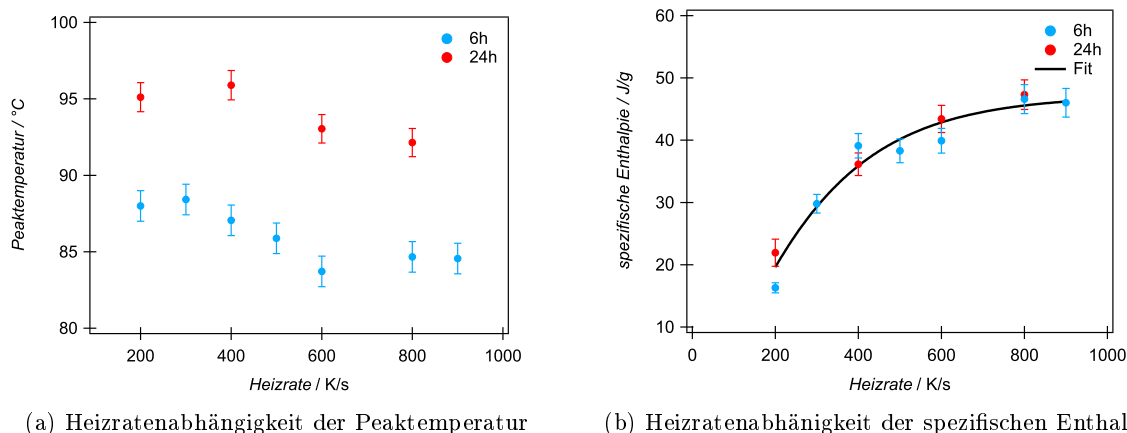


Abbildung 6.11.: **Disaggregations- bzw. Entfaltungsübergang der nach 24 h Inkubation gebildeten A $\beta$ 42-Aggregate** Der endotherme Übergang, der bei Aggregaten, die sich nach 24 h bei physiologischen Bedingungen gebildet haben, beobachtet werden kann, ähnelt stark dem in Abb. 6.9 dargestellten. Vermutlich entfalten sich demnach die gleichen Strukturen. Diesen Schluss legt auch eine TEM-Aufnahme der Aggregate nahe, die neben kurzen Fibrillen auch Protofibrillen und globuläre Aggregate zeigt.

Ein analoges Ergebnis zu dem in Abbildung 6.9 gezeigten für 6 h aggregierte Oligomerlösungen liefert eine entsprechende Messung an einer A $\beta$ 42-Fibrillenlösung nach 24 h Aggregation (vgl. Abb. 6.11). Ein direkter Vergleich von Peaktemperatur und spezifischer Enthalpie, wie ihn Abbildung 6.12 zeigt, ergibt eine etwas höhere Übergangstemperatur nach 24 h, während die Enthalpie an-

nähernd gleich bleibt. Da eine TEM-Aufnahme der Fibrillenlösung neben kurzen Fibrillen auch globuläre Aggregate und Protofibrillen zeigt, liegt der Schluss nahe, dass in beiden Fällen ähnliche Strukturen entfaltet wurden. Um welche Spezies es sich genau handelt, kann auf Grundlage der vorhandenen Daten nicht entschieden werden.



**Abbildung 6.12.: Abhängigkeit der Peaktemperatur und der spezifischen Enthalpie von der Heizrate** Die beobachtete Peaktemperatur intermediärer Aggregate des A $\beta$ 42-Peptids nimmt sowohl nach 6 h als auch nach 24 h mit zunehmender Heizrate tendenziell ab, was auf weniger strukturierte Aggregate aufgrund fehlender Reorganisationsprozesse hindeuten könnte oder darauf, dass bei hohen Scanraten die Zeit nicht ausreicht, um auch hochstrukturierte Aggregate bzw. -bestandteile zu entfalten. Dabei ist die Peaktemperatur der 24 h aggregierten Probe jeweils etwa 10 °C höher. Im Gegensatz dazu nimmt die spezifische Übergangsenthalpie für beide Proben mit zunehmender Heizrate zu und unterscheidet sich bei gleicher Heizrate nur minimal. Die apparente geringe spezifische Enthalpie bei niedrigen Heizraten könnte auf exotherme Reorganisationsprozesse zurückzuführen sein, die bei höheren Heizraten nicht mehr möglich sind. Diese reorganisierten Strukturen dürften dann allerdings nicht oder nur teilweise entfaltet werden, da sie sonst doch zur Enthalpie beitragen würden. Ein logistischer Fit unter Berücksichtigung beider Datensätze ergibt eine spezifische Enthalpie von  $H_{spez}=47.2 \pm 4.0$  J/g für einen von Reorganisationsprozessen freien Disaggregations- bzw. Entfaltungsübergang.

Neben dem oben bereits diskutierten Verhalten der Übergangstemperatur fällt auch auf, dass die spezifische Enthalpie nicht wie erwartet ratenunabhängig ist. Die Abweichungen bei geringen Heizraten sind dabei zu groß, um allein darauf zurückgeführt zu werden, dass sich bei geringeren Signalhöhen die Fläche unterhalb des Signals schlechter bestimmen lässt. Eventuell könnte dies auf bei hohen Heizraten zunehmend unterdrückte exotherme Reorganisationsprozesse hindeuten, deren resultierende Strukturen nicht vollständig entfaltet werden, und daher nicht zur apparenten Enthalpie beitragen.

Da die spezifische Enthalpie eine klare Ratenabhängigkeit zeigt, kann ihr Wert nicht durch simple Mittelwertbildung bestimmt werden. Unter der Annahme, dass mit zunehmender Heizrate mögliche Reorganisationsprozesse während des Entfaltungsübergang unwahrscheinlicher werden und sich die Daten deshalb asymptotisch der tatsächlichen spezifischen Übergangsenthalpie annähern, kann diese jedoch durch Anpassung einer logistischen Funktion abgeschätzt werden. Dazu wurde die generalisierte logistische Funktion unter der Annahme, dass sie im negativen Bereich sich der gleichen ins Negative gespiegelten Asymptote annähert, zu

$$f(x) = -K + \frac{2K}{(1 + Q \exp(-Bx))^{(1/\nu)}} \quad (6.5)$$

vereinfacht. Der Fitparameter  $K$  entspricht dabei dem Wert der Asymptote und damit der abgeschätzten tatsächlichen spezifischen Enthalpie des Entfaltungsübergangs der Aggregate; sie beträgt demnach  $H_{spez}=47.2 \pm 4.0$  J/g.

Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der beobachteten Spezies um Oligomere mit bereits



ausgebildeter  $\beta$ -Faltblattstruktur oder ggf. Protofibrillen handelt, da bspw. für die Fibrillen der N47A-Mutante des SH3-Proteins lediglich eine spezifische Enthalpie von 13.4 J/g gefunden wurde [29]. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass die beobachtete Peaktemperatur des Übergangs deutlich höher ist als die für partiell entfaltete Oligomere des SH3-Proteins, die bei 45-55 °C liegt [177].

Ein weiteres, zusätzliches Übergangssignal konnte für die Fibrillenlösungen im verfügbaren Temperaturbereich nicht beobachtet werden - entweder disaggregieren diese erst oberhalb von 140 °C oder es handelt sich bei der beobachteten disaggregierenden Spezies bereits bzw. zumindest teilweise um Fibrillen. Dazu würde zumindest der Temperaturbereich der Entfaltung passen: SH3-N47A-Fibrillen entfalten sich in wässriger Lösung bei 70-90 °C [29].

Weiterführende Untersuchungen, etwa eine wiederholte Aufnahme von Heizkurven während des Aggregationsprozesse von A $\beta$ 42, um den zeitlichen Verlauf der Thermostabilität mit zunehmendem Aggregationsgrad zu analysieren, waren innerhalb der zur Verfügung stehenden Zeit leider nicht möglich, da sich die Messungen an A $\beta$ 42 unter Verwendung der gleichen Proteincharge zur Herstellung von Lösungen und der gleichen Sensorencharge zwar reproduzieren ließen, nicht aber nach längerer Pause mit neuen Materialchargen. Dies zeigt die hohe Abhängigkeit der Flüssigkeits-FDSC von den Präparationsbedingungen insbesondere bei einem so heterogenen System wie aggregierten A $\beta$ 42-Lösungen.

## 6.4. Zusammenfassung und Fazit

Die Methode der Schnellen Dynamischen Differenz-Kalorimetrie an Flüssigkeiten konnte mittels Messungen an wässrigen Lysozymlösungen unter Charakterisierung der verwendeten Sensoren erfolgreich etabliert werden. Der zugängliche Temperaturbereich liegt dabei zwischen etwa 40 °C und 140 °C für wässrige Lösungen bei Heizkurven; Kühlkurven können aufgrund von Regulationsproblemen bei der Kühlung nur bei Heizraten bis etwa 200 K/s ausgewertet werden. Die Übergangsenthalpie sollte mindestens etwa 2  $\mu$ J betragen, da die Sensitivität der Sensoren sonst nicht für die Signalaufzeichnung genügt. Proben mit geringer spezifischer Übergangsenthalpie werden demnach in hoher Konzentration benötigt.

Ein Problem stellt das nicht genau spezifizierte beheizte Volumen dar, das zur Berechnung der genauen Probenmasse und der spezifischen Übergangsenthalpie benötigt wird. Bei Messungen an A $\beta$ 42-Lösungen wurde dieses Problem umgangen, indem zunächst Lysozym als Referenzprobe gemessen und ausgehend von dem theoretisch erwarteten Wert für die spezifische Enthalpie das beheizte Volumen berechnet wurde. Messungen an A $\beta$ 42-Aggregaten zeigten zudem das zweite Problem der Methode auf - die hohe Abhängigkeit von verwendetem Material und Probenpräparation.

Dennoch konnten an A $\beta$ 42-Aggregaten erste interessante Ergebnisse gewonnen werden: Heizkurven zeigen ein Denaturierungssignal zwischen 60 °C und 110 °C mit einer spezifischen Enthalpie von  $H_{spez}=47.2 \pm 4.0$  J/g, das sich bei höheren Scanraten zu geringeren Temperaturen verschiebt. Zusammen mit der Breite des Signals deutet dies auf einen mehrstufigen Prozess, der bei hohen Heizraten teilweise unterdrückt wird, oder den Beitrag unterschiedlich stark strukturierter Aggregate mit verschiedenen Entfaltungstemperaturen bzw. -geschwindigkeiten zum Signal hin, was durch die Messung eines Stufenprogramms bestätigt werden konnte.



## 7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Aspekte der Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Peptids untersucht: Erstens wurde durch die Burst-Analyse von Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen der Einfluss von am N-Terminus kovalent gebundenen Fluorophoren auf die Größenverteilung von A $\beta$ 40-Oligomeren quantifiziert; das Auftreten von HMW-Oligomeren konnte dabei auf hydrophobe Wechselwirkungen der Fluorophore zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu bildete A $\beta$ 42 auch bei der Wahl eines geeigneten Fluorophors HMW-Oligomere.

Zweitens wurde die Aggregationskinetik von A $\beta$ 40 und der Varianten A $\beta$ 40E22P und A $\beta$ 40G37P mittels ThT Assays über einen Konzentrationsbereich von 2  $\mu$ M bis 160  $\mu$ M aufgenommen und auf Grundlage der Oligomere berücksichtigenden Modelle von *Knowles*, *Linse* und *Dobson* [26, 27] hinsichtlich zugrunde liegender Keimbildungsprozesse analysiert. Bei Konzentrationen oberhalb von 20  $\mu$ M konnte ein zu diesem Zeitpunkt für A $\beta$ 40 neuer Inhibitionseffekt beobachtet werden, der zwischenzeitlich von anderen Autoren beobachtet wurde [144]. Im Konzentrationsbereich darunter wurde für A $\beta$ 40 ein Fibrillen begünstigendes Dimer als Primärkeim der Amyloidfibrillenbildung nachgewiesen, wohingegen vergleichende Messungen mit A $\beta$ 42 und A $\beta$ 42G37P zeigten, dass bei A $\beta$ 42 vermutlich eine Monomerkonversion den Fibrillierungsprozess startet.

Drittens wurde die Thermostabilität von A $\beta$ 42-Aggregaten mittels Schneller Dynamischer Differenz-Kalorimetrie an Flüssigkeiten untersucht und dabei ein vermutlich von fibrillären Oligomeren oder Protofibrillen stammendes Denaturierungssignal zwischen 60 °C und 110 °C mit einer spezifischen Enthalpie von  $H_{spez} = 47.2 \pm 4.0$  J/g nachgewiesen, das sich bei höheren Scanraten zu geringeren Temperaturen verschiebt.

### Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren

Um durch Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen beobachtete Oligomere hinsichtlich Größe, Fluoreszenzlebensdauer und Verweildauer im konfokalen Volumen analysieren zu können, wurde eine Burst-Analyse entwickelt. Mittels der Berechnung einer gleitenden Photonendichte ordnet sie die detektierten Photonen entweder dem Hintergrund zu oder einem Burst, entstanden durch ein durch das konfokale Volumen diffundierendes Peptid oder Aggregat. Die relative Photonenzahl, definiert als Verhältnis der gemessenen Photonenzahl zu der mittleren für ein Monomer detektierten Photonenzahl, charakterisiert dabei die Größe eines beobachteten Oligomers.

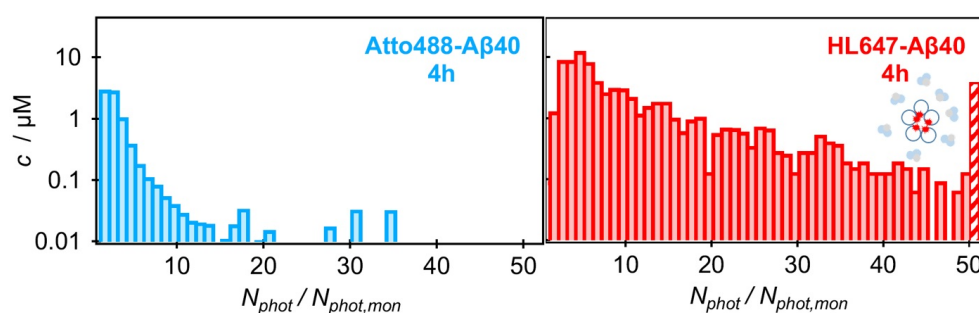


Abbildung 7.1.: **Bildung von HMW-A $\beta$ 40-Oligomeren durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren** Nach vier Stunden Inkubation können für Atto488-A $\beta$ 40 nur vereinzelt HMW-Oligomere mit einer relativen Photonenzahl  $> 10$  beobachtet werden. Die große Zahl an HMW-Oligomeren, die HL647-A $\beta$ 40 bildet, können auf hydrophobe Wechselwirkungen des Fluorophors zurückgeführt werden, durch die Fluorophore von dem wässrigen Lösungsmittel abgeschirmt werden und so die Bildung von HMW-Oligomeren induziert wird.

Unter ansonsten gleichen Präparations- und Inkubationsbedingungen wurden für mit HL647 und Atto655 markierte A $\beta$ -Peptide vermehrt HMW-Oligomere mit einer relativen Photonenzahl von mehr als zehn beobachtet, wogegen diese für Atto488-A $\beta$ 40 und HL488-A $\beta$ 40 nur vereinzelt auf-

traten. Abbildung 7.1 illustriert diesen Unterschied beispielhaft für Atto488-A $\beta$ 40 und HL647-A $\beta$ 40. Die für die beiden roten Fluorophore beobachteten zusätzlichen HMW-Oligomere blieben auch nach Abschluss des Fibrillierungsprozesses in Lösung und führten zugleich zu einer Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer. Letzteres weist auf eine Abschirmung der Fluorophore von der wässrigen Lösung hin und kann mit einer erhöhten Hydrophobizität von HL647 und Atto655 im Vergleich zu Atto488 und HL488 erklärt werden, sodass die Bildung zusätzlicher, nicht zur Fibrillierung beitragender HMW-Oligomere vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Fluorophore induziert wurde. Die Wechselwirkung zwischen Peptid und Fluorophor kann über die Messung des Abfalls der Fluoreszenzanisotropie und die Berechnung der relativen Rate der Reorientierung indirekt quantifiziert werden. Sie eignet sich als Indikator für die potentielle Tauglichkeit eines Fluorophors für die Untersuchung der Oligomere eines Peptids: Eine geringere Wechselwirkung ging einher mit einer geringeren Beeinflussung der Größenverteilung der Oligomere.

Atto488 erwies sich von allen untersuchten Fluorophoren als am besten geeignet für die Markierung von A $\beta$ -Peptiden: Nur 12 % der Peptide zeigen in diesem Fall einen langsamen Anisotropieabfall mit einer Abklingzeit von  $\sim 7$  ns, der Fluorophor bleibt während der Bildung von Oligomeren gleichermaßen der Lösung ausgesetzt und es werden Fibrillen gebildet, deren Morphologie derjenigen des Wildtyps gleicht. Im Gegensatz dazu bilden HL647-A $\beta$ 40 und Atto655-A $\beta$ 40 dünnere und stärker gekrümmte Fibrillen.

Ein Vergleich zwischen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 zeigte, dass A $\beta$ 42 bei den gewählten Inkubationsbedingungen während des Aggregationsprozesses in größerer Zahl HMW-Oligomere bildet, resultierend in einem Mittelwert der Größenverteilung von  $4.5 N_{phot,mon}$  und einer Breite von  $6.5 N_{phot,mon}$  bei einem DOL von 2 %, während die Oligomere von Atto488-A $\beta$ 40 eine schmalere Größenverteilung mit einer Breite von  $3.3 N_{phot,mon}$  und einem geringeren Mittelwert von  $2.9 N_{phot,mon}$  bildeten. Im Fall von Atto488-A $\beta$ 42 wurden die HMW-Oligomere während der Fibrillierung verbraucht und führten nicht zu einer Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer, sind also originär auf die Aggregationseigenschaften des Peptids zurückzuführen.

### Aggregationskinetiken und -mechanismen des A $\beta$ -Peptids

Da die Aggregation des A $\beta$ -Peptids in hohem Maße von den Präparations- und Inkubationsbedingungen abhängt, wurde für die systematische Untersuchung der Aggregationskinetik des A $\beta$ 40-Peptids im Hinblick auf zugrunde liegende primäre und sekundäre Keimbildungsprozesse zunächst ein Präparations- und Inkubationsprotokoll entwickelt, das andere zur Fibrillenbildung beitragende Prozesse wie Fragmentation möglichst exkludiert. Dabei wurde auf ThT Assays und Analytische Ultrazentrifugation zurückgegriffen.

Unter diesen Bedingungen bildet der Wildtyp von A $\beta$ 40 als Primärkeim ein Dimer, wohingegen sich für die Sekundärkeimbildung als maximal mögliche Keimgröße ein Monomer ergab - eine Reaktionsordnung nahe null legte für letztere sogar nahe, dass hier ggf. noch andere Effekte zum Tragen kommen. Zum Beispiel könnte eine bereits existierende Fibrille nicht nur die Bildung neuer Keime an ihrer Oberfläche begünstigen, sondern selbst als Keim oder Schablone für weitere Fibrillenbildung dienen. Dieses Resultat für die Primär- und Sekundärkeime ergab sich übereinstimmend durch die Analyse des konzentrationsabhängigen Abfalls von Halbzzeit und Lagzeit, eine Analyse nach dem Modell von *Dovidchenko et al.* [62] sowie die Anwendung der aktuellen, eine Oligomerbildung berücksichtigenden Modelle von *Knowles, Linse* und *Dobson* [26, 27] und passt gut zu bisherigen Ergebnissen in der Literatur [55, 149]. Auch FCS-Messungen stützen die Annahme eines Dimers als Primärkeim und zeigen damit, dass die aus den *a priori* verwendeten Modellannahmen gewonnenen Keimgrößen sich in der experimentellen Realität widerspiegeln. Sie deuten zudem daraufhin, dass es sich bei dem Primärkeim der A $\beta$ 40-Fibrillenbildung um ein amyloid-begünstigendes Dimer handelt und der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Keimbildung die Konformationsänderung des globulären Dimers hin zu einem „ $\beta$ -Dimer“ ist. Ein solches fibrilläres Dimer wurde auch als Grundbaustein von A $\beta$ -Fibrillen identifiziert [148, 149], was die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiter stützt. Aus einer globalen Analyse gemäß des oben genannten Modells von

Knowles, Linse und Dobson ergab sich zudem eine um einen Faktor zehn größere Geschwindigkeitskonstante der Sekundärkeimbildung im Vergleich zur Primärkeimbildung.

Die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit von Halb-, Wachstums- und Lagzeit zeigte jedoch auch, dass oberhalb von 20  $\mu\text{M}$  bei 37  $^{\circ}\text{C}$  bzw. oberhalb von 40  $\mu\text{M}$  bei Raumtemperatur ein Übergang zu einer Sättigung bis Inhibition der Aggregation stattfindet. Ein solcher Inhibitionseffekt war zum Zeitpunkt der Aufnahme der Experimente nur für Insulin [141], Lysozym und ein künstlich erzeugtes  $\beta$ -Dimer [143] beobachtet worden, wurde zwischenzeitlich aber auch für A $\beta$ 40 selbst bestätigt [144].

Vergleichend zum Wildtyp des A $\beta$ 40-Peptids wurden auch die Prolin-Varianten E22P und G37P untersucht. A $\beta$ -Varianten mit einer Mutation an der 22. Stelle wurden mit dem Auftreten der familiären Alzheimer-Krankheit und von zerebraler Amyloidangiopathie in Verbindung gebracht und gingen potentiell mit einer beschleunigten Aggregation einher [150]-[153]. Im Gegensatz dazu wirkt eine Mutation im Bereich des C-Terminus potentiell verlangsamernd auf den Aggregationsprozess [155, 156]. Diese grundsätzliche Tendenz wurde auch in dieser Arbeit bestätigt.

Für die gemeinsame Analyse der drei Varianten wurden zunächst diejenigen Bereiche identifiziert, in denen mit zunehmender Konzentration ein Abfall der Halbzeit beobachtet werden kann. In diesem Konzentrationsbereich wurden dann per globaler Analyse die Kenngrößen der Keimbildung bestimmt (vgl. Abb. 7.2).

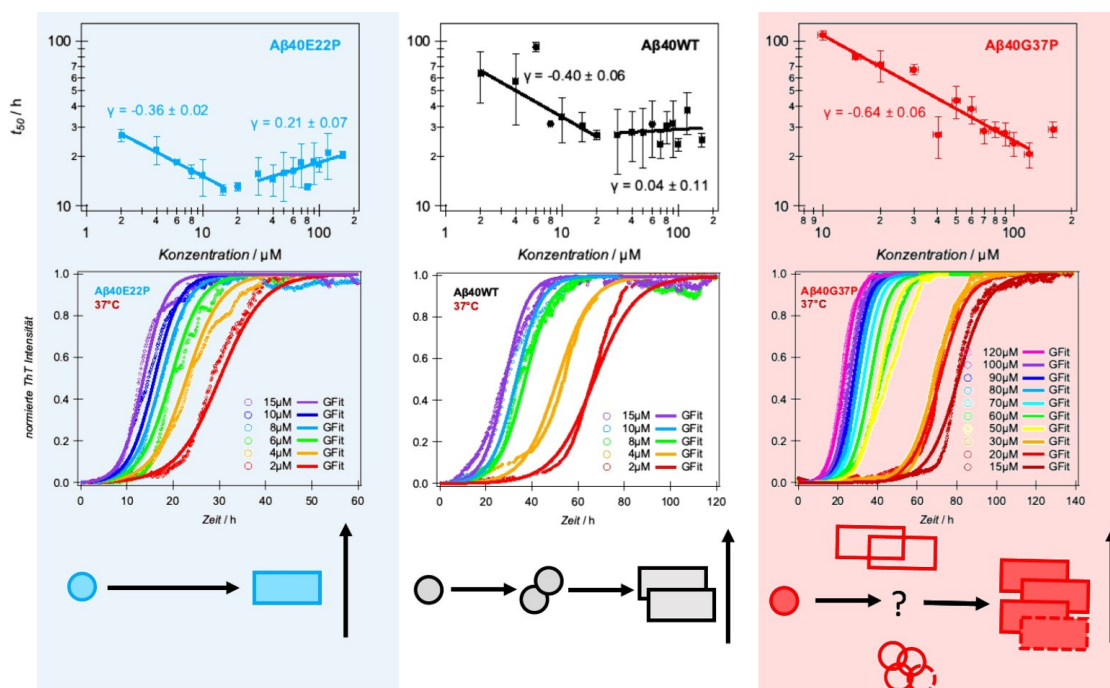


Abbildung 7.2.: **Analyse der Aggregationskinetiken von A $\beta$ 40-Varianten auf zugrunde liegende Keimbildungsprozesse** Die Auftragung der in ThT Assays gemessenen Halbzeit gegen die Konzentration erlaubt es, Konzentrationsbereiche zu identifizieren, in denen die Halbzeit mit zunehmender Konzentration abfällt. In diesem Konzentrationsbereich wurden die ThT Assays durch eine globale Anpassung einer Funktion gemäß 3.46 hinsichtlich zugrunde liegender Keimbildungsprozesse analysiert. Die drei untersuchten A $\beta$ 40-Varianten A $\beta$ 40WT (mittig), A $\beta$ 40E22P (links in blau) und A $\beta$ 40G37P (rechts in rot) unterscheiden sich dabei insbesondere hinsichtlich der Primärkeimbildung: Während beim Wildtyp die Primärnukleation hauptsächlich mittels eines amyloid-begünstigenden Dimers verläuft, wird bei der A $\beta$ 40E22P-Variante ein Fibrillierungsstart durch Monomerkonversion wahrscheinlicher. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Reaktionsordnung der Primärkeimbildung bei A $\beta$ 40G37P auf etwas mehr als drei, auch ein Tetramer wäre hier noch als Ausgangspunkt der Fibrillenbildung denkbar. Der vertikale Pfeil im Anschluss an den Keimbildungsprozess indiziert das dann folgende rasche Wachstum durch Monomeraddition. Die hier gezeigten Daten wurden bei 37  $^{\circ}\text{C}$  aufgenommen.

Dabei wurde auch für A $\beta$ 40E22P ein Inhibitionseffekt bei Konzentrationen ab 20  $\mu$ M sichtbar; dieser trat jedoch nicht bei A $\beta$ 40G37P auf. Die drei Varianten unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich der Primärkeimbildung: Die Geschwindigkeitskonstanten der Sekundärkeimbildung unterscheiden sich um maximal einen Faktor zwei von der des Wildtyps und die Reaktionsordnung der Sekundärnukleation liegt immer zwischen null und eins, außer im Fall von A $\beta$ 40E22P bei Raumtemperatur, wo sie etwas größer als eins ist. Die Sekundärkeimbildung wird demnach wenig durch die Prolin-Mutation beeinflusst. Ganz anders die Primärkeimbildung: Hier ist die Geschwindigkeitskonstante für A $\beta$ 40E22P bis zu sechs- bis siebenfach größer und für A $\beta$ G37P um das bis zu Achtzigfache geringer. Zudem kann die Prolin-Mutation die Größe des Primärkeims sowohl in Richtung eines Monomers als auch hin zu Tri- bis Tetrameren verschieben. Die Mutation an der 22. Stelle erhöht bei 37 °C die Wahrscheinlichkeit, dass statt eines Dimers die Konformationsänderung eines Monomers den Fibrillierungsprozess startet. Bei Raumtemperatur hingegen und bei der Mutation an der 37. Stelle scheint ein Dimer nicht ausreichend stabil, um den kritischen Keim zu bilden, sodass die Energiebarriere der Keimbildung stattdessen bei Tri- bis Tetrameren liegt.

Das Inhibitionsverhalten im hohen Konzentrationsbereich kann für A $\beta$ 40E22P vermutlich durch einen zusätzlichen Capping-Effekt [141] erklärt werden, bei dem sich an einem Fibrillenende Oligomere bilden und so die Elongation durch Monomeraddition behindern. Eine Analyse des Verhaltens von Primär- und Sekundärkeimbildung im Bereich hoher Konzentration durch Funktionsanpassungen gemäß Gleichung 3.53 ergab für A $\beta$ 40WT bei 37 °C, dass die Inhibition hier auf die Primärkeimbildung wirkt. Welcher Effekt dahinter stehen könnte, ist unklar; ggf. werden bei höheren Konzentrationen größere globuläre Oligomere gebildet, deren Konformationsänderung langsamer verläuft als für ein Dimer. Zumindest eine Sättigung der Primärkeimbildung von A $\beta$ 40 wurde kürzlich auch in der Literatur demonstriert [159]. Bei Raumtemperatur hängt die Halbwertszeit unterhalb von 6-8  $\mu$ M nicht mehr von der Konzentration ab; hier spielen ggf. Wandeffekte, etwa die Adsorption globulärer Oligomere oder heterogene Keimbildung an den Wänden, eine Rolle. Sowohl die Wandeffekte als auch der Capping-Effekt können durch entsprechende Zusatzterme in den Differentialgleichungen in die bestehenden Modelle mit Berücksichtigung von Oligomeren [26, 27] integriert werden.

Bei A $\beta$ 42WT und A $\beta$ 42G37P, die abschließend analysiert wurden, beginnt die Fibrillenbildung sowohl auf dem primären als auch dem sekundären Keimbildungspfad vermutlich mit der Konformationsänderung eines Monomers hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt begünstigenden Konformation. Dass eine solche Konformationsänderung für A $\beta$ 42 möglich ist, wurde auch mittels NMR und MD-Simulationen nachgewiesen [160, 161]. Interessanterweise war die Geschwindigkeitskonstante der Sekundärkeimbildung für A $\beta$ 42 sogar geringer als für A $\beta$ 40, wohingegen die Geschwindigkeitskonstante der Primärkeimbildung etwa dreimal so groß war. Dies steht im Gegensatz zu Literaturergebnissen, nach denen insbesondere Differenzen in der Sekundärkeimbildung für die Unterschiede in den Aggregationskinetiken von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 verantwortlich sind [55]. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unter den hier genutzten Präparations- und Inkubationsbedingungen fundamentale Unterschiede in der Primärkeimbildung, wohingegen sich die Sekundärkeimbildung in allen Fällen ähnelte.

### Flüssigkeits-FDSC-Untersuchungen der Thermostabilität des A $\beta$ 42-Peptids

Mittels Messungen an Lysozym, dessen thermische Eigenschaften aus der Literatur umfassend bekannt sind, wurden die Flüssigkeits-FDSC in der Fachgruppe etabliert und die dafür eingesetzten Flüssigkeitssensoren hinsichtlich Messbereich und Sensitivität charakterisiert. Dabei konnte bei wässrigen Lösungen für Heizkurven ein Temperaturbereich zwischen etwa 40 °C und 140 °C analysiert werden. Unterhalb dieses Bereichs überlagern Regulationsschwingungen mögliche thermische Signale. Bei darüber liegenden Temperaturen wird die Membran der Sensoren zunächst stark beansprucht und ab etwa 160 °C irreversibel zerstört. Kühlkurven können aufgrund von Regulationsproblemen nur für Kühlraten bis etwa 200 K/s ausgewertet werden. Die Sensitivität der Sensoren ist auf thermische Signale mit einer Übergangsenthalpie von mindestens 2  $\mu$ J begrenzt; Proben mit geringer spezifischer Übergangsenthalpie können demnach nur in hohen Konzentrationen gemessen

werden.

Das beheizte Volumen, das zur Berechnung von beheizter Probenmasse und spezifische Übergangsenthalpie benötigt wird, hängt von den individuellen Sensoren ab und kann daher nur über die Messung einer Referenzprobe mit einem thermischen Übergang bekannter spezifischer Enthalpie ermittelt werden. Für die Messungen an A $\beta$ 42-Aggregaten wurde als Referenz das bereits zur Sensorcharakterisierung genutzte Lysozym eingesetzt.

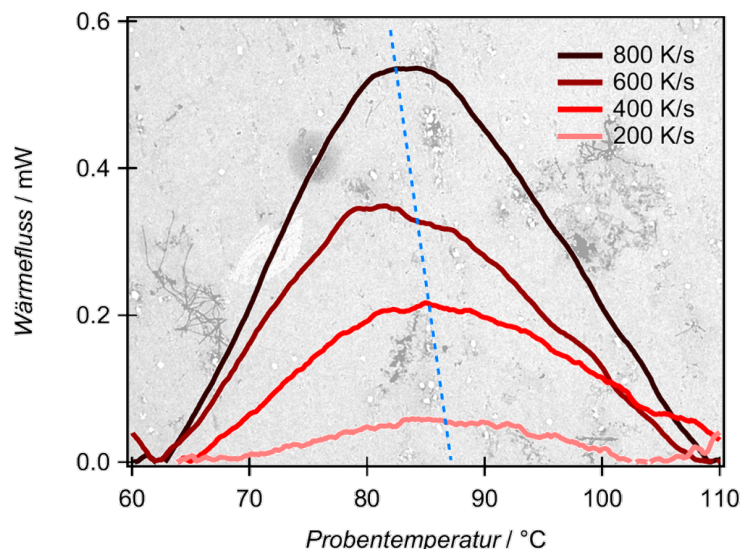


Abbildung 7.3.: **Disaggregations- bzw. Entfaltungsübergang von A $\beta$ 42-Aggregaten** Heizkurven an A $\beta$ 42-Lösungen, in denen sich nach 6 h Inkubation globuläre Oligomere und Protofibrillen gebildet haben, zeigen ein breites endothermes Signal, das sich mit zunehmender Heizrate zu geringeren Temperaturen verschiebt. Dieses Verhalten kann durch einen mehrstufigen Prozess oder die Entfaltung unterschiedlich stark strukturierter Aggregate erklärt werden, wobei bei hohen Heizraten Teilprozesse der Entfaltung bzw. Disaggregation unterdrückt werden.

Für kleinere A $\beta$ 42-Aggregate - vermutlich fibrilläre Oligomere oder Protofibrillen - wurde ein Denaturierungssignal zwischen 60 °C und 110 °C mit einer spezifischen Enthalpie von  $H_{spez} = 47.2 \pm 4.0$  J/g beobachtet, das sich entgegen der Erwartung bei höheren Scanraten zu geringeren Temperaturen verschiebt (s. Abb. 7.3). Mithilfe eines stufenförmigen Messprogramms konnte gezeigt werden, dass das Signal entweder von einem mehrstufigen Prozess kommt oder unterschiedlich stark strukturierte Aggregate mit verschiedenen Entfaltungs- bzw. Disaggregationsübergängen zu dem Signal beitragen. In beiden Fällen würden langsamer und erst bei höheren Temperaturen ablaufende Prozesse durch hohe Heizraten teilweise unterdrückt, was die untypische Verschiebung des Signals erklärt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bieten Raum für weitergehende Fragestellungen: Die Aggregationskinetik der untersuchten A $\beta$ -Peptide wurde nur hinsichtlich der kombinierten Geschwindigkeitskonstanten  $kkk1$  und  $kkk2$  analysiert, die sich aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Zusammenlagerung eines primären bzw. sekundären Keims, für die Konformationsänderung hin zu einem fibrillären Monomer oder Oligomer und für die Elongation zusammensetzen. Sogenannte *Seeding*-Experimente, bei denen den aggregierenden Lösungen Fibrillen in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt werden, könnten zu einer Distinktion der verschiedenen Einzelprozesse beitragen - dies wurde in der Literatur beispielsweise für das Parathormon unter Nutzung derselben Aggregationsmodelle beschrieben [178]. Die Elongationsgeschwindigkeitskonstante kann ebenso durch Experimente in einer Thermophoretischen Falle bestimmt werden - entsprechende Experimente wurden für die hier betrachteten A $\beta$ 40-Peptide innerhalb des Forschungsverbunds SFB/TRR102 bereits durchgeführt (s. Abb. B.11 in Anhang B.7). Ein weitergehender Schritt wä-

re die Untersuchung des Aggregationsverhaltens in Gegenwart sogenannter *Crowder*, d.h. anderer Makromoleküle, die einen signifikanten Anteil des Lösungsvolumens einnehmen und *in vivo* typischerweise vorhanden sind. Aufbauend auf den hier präsentierten Ergebnissen wurde eine solche Analyse bereits für den Einfluss von PEG und Ficoll auf die Fibrillierung von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 vorgelegt [105].

Für die Untersuchung von Amyloiden mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde mit dem Abfall der Fluoreszenzanisotropie ein Kriterium gefunden, das einen ersten Eindruck der Eignung eines Fluorophors für die Markierung eines Peptids liefert. Die entwickelte Burst-Analyse kann auch für die Charakterisierung der Oligomere oder Fibrillen anderer Peptide genutzt werden und wurde z.B. im Rahmen einer Masterarbeit zur Untersuchung des Parathormons eingesetzt [179].

Damit können die eingangs genannten Fragestellungen zur Aggregation des A $\beta$ -Peptids folgendermaßen beantwortet werden:

1. Kovalent am N-Terminus gebundene Fluorophore können durch hydrophobe Wechselwirkungen die Bildung von HMW-Oligomeren induzieren, die nicht Teil des Aggregationsprozesses des A $\beta$ -Peptids sind. Eine sorgfältige Auswahl der verwendeten Fluorophore ist daher essentiell, um mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie die Bildung von Oligomeren untersuchen zu können. Von den in dieser Arbeit analysierten Farbstoffen eignet sich Atto488 am besten zur Analyse der Aggregation des A $\beta$ -Peptids.
2. Der Keimbildungsprozess des A $\beta$ 40-Peptids verläuft auf dem Primärpfad vermittels eine fibrillären Dimers, wohingegen die Sekundärkeimbildung eine Reaktionsordnung zwischen null und eins hat. Die Größe des Primärkeims kann durch Mutationen oder Temperaturunterschiede sowohl in Richtung eines Monomers als auch hin zu Tri- bis Tetrameren verschoben werden. Die Primärkeimbildung von A $\beta$ 42 beginnt im Gegensatz dazu wahrscheinlich mit der Konformationsänderung eines Monomers. Um das Aggregationsverhalten bei sehr geringen Konzentrationen und die Selbst-Inhibition bei hohen Konzentrationen zu beschreiben, müsste das in dieser Arbeit hauptsächlich genutzte Aggregationsmodell [26, 27] um zusätzliche Terme ergänzt werden.
3. Die Flüssigkeits-FDSC ermöglicht die Aufnahme von Heizkurven mit Scanraten von mehreren hundert K/s im Temperaturbereich zwischen 40 °C und 140 °C in wässrigen Lösungen, hängt jedoch stark von den verwendeten Flüssigkeitssensoren und der Probenpräparation ab. Kühlkurven können aufgrund starker regulatorischer Schwankungen nicht ausgewertet werden. Für quantitative Analysen sind zudem Referenzmessungen mit bekannten Proben notwendig. Für A $\beta$ 42-Aggregate konnte ein thermischer Übergang bei 60 °C und 110 °C mit einer spezifischen Enthalpie von  $H_{spez}=47.2 \pm 4.0$  J/g beobachtet werden.



# Literatur

- [1] Alexander K. Buell. “The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils”. In: *International review of cell and molecular biology* 329 (2017), S. 187–226. ISSN: 1937-6448. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.014.
- [2] M. Sunde u. a. “Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction”. In: *Journal of Molecular Biology* 273.3 (1997), S. 729–739. ISSN: 00222836. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1348.
- [3] W. T. Astbury, S. Dickinson und K. Bailey. “The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins”. In: *The Biochemical journal* 29.10 (1935), S. 2351–2360.1. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj0292351.
- [4] Pu Chun Ke u. a. “Half a century of amyloids: past, present and future”. In: *Chemical Society reviews* 49.15 (2020), S. 5473–5509. DOI: 10.1039/c9cs00199a.
- [5] Chi L. L. Pham, Ann H. Kwan und Margaret Sunde. “Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose”. In: *Essays in biochemistry* 56 (2014), S. 207–219. DOI: 10.1042/BSE0560207.
- [6] Fabrizio Chiti und Christopher M. Dobson. “Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade”. In: *Annual Review of Biochemistry* 86 (2017), S. 27–68. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
- [7] Alison Abbott. “Dementia: a problem for our age”. In: *Nature* 475.7355 (2011), S2–4. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/475S2a.
- [8] Karie N. Dahlgren u. a. “Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability”. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.35 (2002), S. 32046–32053. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M201750200.
- [9] Dominic M. Walsh und Dennis J. Selkoe. “A beta oligomers - a decade of discovery”. In: *Journal of neurochemistry* 101.5 (2007), S. 1172–1184. ISSN: 0022-3042. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x.
- [10] C. L. Masters u. a. “Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82.12 (1985), S. 4245–4249. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.82.12.4245.
- [11] Robert Vassar u. a. “The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer’s disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential”. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.41 (2009), S. 12787–12794. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.
- [12] Christian Haass und Dennis J. Selkoe. “Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid beta-peptide”. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8.2 (2007), S. 101–112. DOI: 10.1038/nrm2101.
- [13] Steven D. Quinn u. a. “Real-time probing of  $\beta$ -amyloid self-assembly and inhibition using fluorescence self-quenching between neighbouring dyes”. In: *Molecular BioSystems* 10.1 (2014), S. 34–44. DOI: 10.1039/C3MB70272C. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/mb/c3mb70272c>.
- [14] Kyle D. Dukes, Cassandra F. Rodenberg und Robin K. Lammi. “Monitoring the earliest amyloid-beta oligomers via quantized photobleaching of dye-labeled peptides”. In: *Analytical biochemistry* 382.1 (2008), S. 29–34. ISSN: 1096-0309. DOI: 10.1016/j.ab.2008.07.011.

- [15] L. O. Tjernberg u. a. “Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy”. In: *Chemistry & Biology* 6.1 (1999), S. 53–62. ISSN: 1074-5521. DOI: 10.1016/s1074-5521(99)80020-9.
- [16] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN: 0-387-31278-1.
- [17] Hao Ding u. a. “Determination of the oligomer size of amyloidogenic protein beta-amyloid(1-40) by single-molecule spectroscopy”. In: *Biophysical journal* 97.3 (2009), S. 912–921. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.05.035.
- [18] Priyanka Narayan u. a. “The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid- $\beta$ (1-40) peptide”. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 19.1 (2011), S. 79–83. ISSN: 1545-9985. DOI: 10.1038/nsmb.2191. URL: <https://www.nature.com/articles/nsmb.2191>.
- [19] Robin D. Johnson u. a. “Direct observation of single amyloid- $\beta$ (1-40) oligomers on live cells: binding and growth at physiological concentrations”. In: *PLoS ONE* 6.8 (2011), e23970. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0023970. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023970>.
- [20] Juliane Adler u. a. “Local interactions influence the fibrillation kinetics, structure and dynamics of A $\beta$ (1-40) but leave the general fibril structure unchanged”. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 16.16 (2014), S. 7461–7471. ISSN: 1463-9084. DOI: 10.1039/c3cp54501f.
- [21] Francesco Bemporad und Fabrizio Chiti. “Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships”. In: *Chemistry & biology* 19.3 (2012), S. 315–327. ISSN: 1879-1301. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.
- [22] Rosa Crespo u. a. “A generic crystallization-like model that describes the kinetics of amyloid fibril formation”. In: *The Journal of biological chemistry* 287.36 (2012), S. 30585–30594. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M112.375345.
- [23] Kelton Greer. *Nucleation*. Oxford: Pergamon, 1997. ISBN: 978-0-08-042147-6.
- [24] Frank Ferrone. “[17] Analysis of protein aggregation kinetics”. In: *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*. Bd. 309. Methods in Enzymology. Elsevier, 1999, S. 256–274. ISBN: 9780121822101. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)09019-9.
- [25] Cheng-Tai Lee und Eugene M. Terentjev. “Mechanisms and rates of nucleation of amyloid fibrils”. In: *The Journal of chemical physics* 147.10 (2017), S. 105103. DOI: 10.1063/1.4995255.
- [26] Alexander J. Dear u. a. “Kinetic diversity of amyloid oligomers”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117.22 (2020), S. 12087–12094. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1922267117.
- [27] Thomas C. T. Michaels u. a. “Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer’s A $\beta$ 42 peptide”. In: *Nature chemistry* 12.5 (2020), S. 445–451. DOI: 10.1038/s41557-020-0452-1.
- [28] Michael R. Sawaya u. a. “The expanding amyloid family: Structure, stability, function, and pathogenesis”. In: *Cell* 184.19 (2021), S. 4857–4873. DOI: 10.1016/j.cell.2021.08.013.
- [29] Bertrand Morel, Lorena Varela und Francisco Conejero-Lara. “The thermodynamic stability of amyloid fibrils studied by differential scanning calorimetry”. In: *The journal of physical chemistry. B* 114.11 (2010), S. 4010–4019. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp9102993.
- [30] R. Splinter u. a. “Fast differential scanning calorimetry of liquid samples with chips”. In: *Thermochimica Acta* 603 (2015), S. 162–171. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/j.tca.2014.07.013.

- [31] David Whitford. *Proteins: Structure and Function*. New York, NY: John Wiley & Sons, 2013. ISBN: 9781118685723.
- [32] Tuomas P. J. Knowles, Michele Vendruscolo und Christopher M. Dobson. “The amyloid state and its association with protein misfolding diseases”. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15.6 (2014), S. 384–396. DOI: 10.1038/nrm3810.
- [33] Douglas M. Fowler u. a. “Functional amyloid—from bacteria to humans”. In: *Trends in biochemical sciences* 32.5 (2007), S. 217–224. ISSN: 0968-0004. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.03.003.
- [34] Jason Greenwald und Roland Riek. “Biology of amyloid: structure, function, and regulation”. In: *Structure (London, England : 1993)* 18.10 (2010), S. 1244–1260. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009.
- [35] F. Ulrich Hartl und Manajit Hayer-Hartl. “Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo”. In: *Nature structural & molecular biology* 16.6 (2009), S. 574–581. DOI: 10.1038/nsmb.1591.
- [36] Fabrizio Chiti und Christopher M. Dobson. “Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease”. In: *Annual Review of Biochemistry* 75.1 (2006), S. 333–366. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- [37] Gunilla T. Westermark, Kenneth H. Johnson und Per Westermark. “[1] Staining methods for identification of amyloid in tissue”. In: *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*. Bd. 309. Methods in Enzymology. Elsevier, 1999, S. 3–25. ISBN: 9780121822101. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)09003-5.
- [38] E. D. Eanes und G. G. Glenner. “X-ray diffraction studies on amyloid filaments”. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 16.11 (1968), S. 673–677. ISSN: 0022-1554. DOI: 10.1177/16.11.673.
- [39] Rebecca Nelson u. a. “Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils”. In: *Nature* 435.7043 (2005), S. 773–778. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature03680.
- [40] Michael R. Sawaya u. a. “Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers”. In: *Nature* 447.7143 (2007), S. 453–457. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature05695.
- [41] Jessica Meinhardt u. a. “Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils”. In: *Journal of Molecular Biology* 386.3 (2009), S. 869–877. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.005.
- [42] Marcus Fändrich. “Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity”. In: *Journal of Molecular Biology* 421.4-5 (2012), S. 427–440. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.01.006.
- [43] D. M. Walsh u. a. “Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates”. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.36 (1999), S. 25945–25952. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.274.36.25945.
- [44] C. S. Goldsbury u. a. “Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors”. In: *Journal of structural biology* 130.2-3 (2000), S. 217–231. ISSN: 1047-8477. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4259.
- [45] Timo Eichner und Sheena E. Radford. “A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold”. In: *Molecular cell* 43.1 (2011), S. 8–18. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.05.012.
- [46] Martin Ingelsson. “Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson’s Disease and Other Lewy Body Disorders”. In: *Frontiers in neuroscience* 10 (2016), S. 408. ISSN: 1662-4548. DOI: 10.3389/fnins.2016.00408.

- [47] M. Volmer und A. Weber. “Keimbildung in übersättigten Gebilden”. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 119U.1 (1926). ISSN: 0942-9352. DOI: 10.1515/zpch-1926-11927.
- [48] Fumio Oosawa und Michiki Kasai. “A theory of linear and helical aggregations of macromolecules”. In: *Journal of Molecular Biology* 4.1 (1962), S. 10–21. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/S0022-2836(62)80112-0.
- [49] Eri Chatani und Naoki Yamamoto. “Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation”. In: *Biophysical reviews* 10.2 (2018), S. 527–534. ISSN: 1867-2450. DOI: 10.1007/s12551-017-0353-8.
- [50] Dimo Kashchiev und Stefan Auer. “Nucleation of amyloid fibrils”. In: *The Journal of chemical physics* 132.21 (2010), S. 215101. DOI: 10.1063/1.3447891.
- [51] A. Lomakin u. a. “On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.3 (1996), S. 1125–1129. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1125.
- [52] T. R. Serio u. a. “Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant”. In: *Science (New York, N. Y.)* 289.5483 (2000), S. 1317–1321. DOI: 10.1126/science.289.5483.1317.
- [53] Stefan Auer, Piero Ricchiuto und Dimo Kashchiev. “Two-step nucleation of amyloid fibrils: omnipresent or not?” In: *Journal of Molecular Biology* 422.5 (2012), S. 723–730. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.06.022.
- [54] Samuel I. A. Cohen u. a. “Proliferation of amyloid- $\beta$ 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.24 (2013), S. 9758–9763. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1218402110.
- [55] Georg Meisl u. a. “Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.26 (2014), S. 9384–9389. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1401564111.
- [56] Georg Meisl u. a. “Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models”. In: *Nature protocols* 11.2 (2016), S. 252–272. DOI: 10.1038/nprot.2016.010.
- [57] Alexei V. Finkelstein, Nikita V. Dovidchenko und Oxana V. Galzitskaya. “What is Responsible for Atypical Dependence of the Rate of Amyloid Formation on Protein Concentration: Fibril-Catalyzed Initiation of New Fibrils or Competition with Oligomers?” In: *The journal of physical chemistry letters* 9.5 (2018), S. 1002–1006. DOI: 10.1021/acs.jpcllett.7b03442.
- [58] Anđela Šarić u. a. “Kinetics of spontaneous filament nucleation via oligomers: Insights from theory and simulation”. In: *The Journal of chemical physics* 145.21 (2016), S. 211926. DOI: 10.1063/1.4965040.
- [59] Frank A. Ferrone. “Assembly of A $\beta$  proceeds via monomeric nuclei”. In: *Journal of Molecular Biology* 427.2 (2015), S. 287–290. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.10.028.
- [60] Samuel I. A. Cohen u. a. “Nucleated polymerization with secondary pathways. II. Determination of self-consistent solutions to growth processes described by non-linear master equations”. In: *The Journal of chemical physics* 135.6 (2011), S. 065106. DOI: 10.1063/1.3608917.
- [61] Samuel I. A. Cohen u. a. “Nucleated polymerization with secondary pathways. I. Time evolution of the principal moments”. In: *The Journal of chemical physics* 135.6 (2011), S. 065105. DOI: 10.1063/1.3608916.

- [62] Nikita V. Dovidchenko, Alexey V. Finkelstein und Oxana V. Galzitskaya. “How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. I. Modeling the amyloid protofibril formation”. In: *The journal of physical chemistry. B* 118.5 (2014), S. 1189–1197. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp4083294.
- [63] Nikita V. Dovidchenko u. a. “One of the possible mechanisms of amyloid fibrils formation based on the sizes of primary and secondary folding nuclei of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42”. In: *Journal of structural biology* 194.3 (2016), S. 404–414. ISSN: 1047-8477. DOI: 10.1016/j.jsb.2016.03.020.
- [64] Michel Goedert und Maria Grazia Spillantini. “A century of Alzheimer’s disease”. In: *Science (New York, N.Y.)* 314.5800 (2006), S. 777–781. DOI: 10.1126/science.1132814. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17082447/>.
- [65] Janelle Nunan und David H. Small. “Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases”. In: *FEBS Letters* 483.1 (2000), S. 6–10. ISSN: 00145793. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02076-7.
- [66] J. T. Jarrett, E. P. Berger und P. T. Lansbury. “The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease”. In: *Biochemistry* 32.18 (1993), S. 4693–4697. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00069a001.
- [67] Anant K. Paravastu u. a. “Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer’s beta-amyloid fibrils”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.47 (2008), S. 18349–18354. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0806270105.
- [68] Marielle Aulikki Wälti u. a. “Atomic-resolution structure of a disease-relevant A $\beta$ (1-42) amyloid fibril”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113.34 (2016), E4976–84. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1600749113.
- [69] Verena H. Finder u. a. “The recombinant amyloid-beta peptide Abeta1-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic Abeta1-42”. In: *Journal of Molecular Biology* 396.1 (2010), S. 9–18. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.12.016.
- [70] L. M. Jungbauer u. a. “Preparation of fluorescently-labeled amyloid-beta peptide assemblies: the effect of fluorophore conjugation on structure and function”. In: *Journal of molecular recognition : JMR* 22.5 (2009), S. 403–413. DOI: 10.1002/jmr.948.
- [71] Jana Wägele u. a. “How Fluorescent Tags Modify Oligomer Size Distributions of the Alzheimer Peptide”. In: *Biophysical journal* 116.2 (2019), S. 227–238. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.12.010.
- [72] Nina V. Visser u. a. “Journal of Fluorescence, Vol. 9, No. 3, 1999 Comparison Between Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy as Illustrated with a Fluorescent Dextran Conjugate”. In: *Journal of Fluorescence* 9 (1999), S. 251–255.
- [73] Douglas Magde, Elliot Elson und W. W. Webb. “Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy”. In: *Physical Review Letters* 29.11 (1972), S. 705–708. ISSN: 0031-9007. DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705.
- [74] Th. Förster. “Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz”. In: *Annalen der Physik* 437.1-2 (1948), S. 55–75. ISSN: 0003-3804. DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- [75] Haitao Li u. a. “Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA molecules”. In: *Analytical chemistry* 75.7 (2003), S. 1664–1670. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac026367z..
- [76] Marvin Minsky. “Microscopy Apparatus”. Pat. US3013467A. 1961.
- [77] T. Hirschfeld. “Optical microscopic observation of single small molecules”. In: *Applied Optics* 15.12 (1976), S. 2965–2966.

- [78] G. J. Brakenhoff u. a. “Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy”. In: *Nature* 317.6039 (1985), S. 748–749. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/317748a0.
- [79] W. B. Amos und J. G. White. “How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research”. In: *Biology of the Cell* 95.6 (2003), S. 335–342. ISSN: 02484900. DOI: 10.1016/S0248-4900(03)00078-9.
- [80] Achillefs N. Kapanidis und Terence Strick. “Biology, one molecule at a time”. In: *Trends in biochemical sciences* 34.5 (2009), S. 234–243. ISSN: 0968-0004. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.01.008.
- [81] Maria Ott. “Konformationsänderung und enzymatische Aktivität am einzelnen Molekül”. Dissertation. Lübeck: Universität zu Lübeck, 2008.
- [82] Markus Sauer, Johan Hofkens und Jörg Enderlein. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: From single molecules to ensemble*. Weinheim und Chichester: Wiley-VCH und John Wiley distributor, 2011. ISBN: 978-3-527-31669-4.
- [83] Bernard Valeur. *Molecular fluorescence: Principles and applications*. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN: 3-527-60024-8.
- [84] R. Rigler u. a. “Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion”. In: *European Biophysics Journal* 22.3 (1993). ISSN: 0175-7571. DOI: 10.1007/BF00185777.
- [85] Michael Wahl. *Time-Correlated Single Photon Counting*. PicoQuant. URL: [http://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote\\_tcspc.pdf](http://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf) (besucht am 19.08.2015).
- [86] Jerker Widengren, Uelo Mets und Rudolf Rigler. “Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study”. In: *The Journal of Physical Chemistry* 99.36 (1995), S. 13368–13379. ISSN: 0022-3654. DOI: 10.1021/j100036a009.
- [87] S. R. Aragón und R. Pecora. “Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics”. In: *The Journal of chemical physics* 64.4 (1976), S. 1791–1803. DOI: 10.1063/1.432357.
- [88] Jörg Enderlein u. a. “Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration”. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 6.11 (2005), S. 2324–2336. ISSN: 1439-4235. DOI: 10.1002/cphc.200500414.
- [89] Jörg Enderlein u. a. “Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy”. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5.2 (2004), S. 155–161. ISSN: 13892010. DOI: 10.2174/1389201043377020.
- [90] Samuel T. Hess und Watt W. Webb. “Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy”. In: *Biophysical journal* 83.4 (2002), S. 2300–2317. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73990-8.
- [91] M. Eigen und R. Rigler. “Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.13 (1994), S. 5740–5747. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.91.13.5740.
- [92] Jerker Widengren u. a. “Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection”. In: *Analytical chemistry* 78.6 (2006), S. 2039–2050. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac0522759.
- [93] Richard W. Clarke, Angel Orte und David Klenerman. “Optimized threshold selection for single-molecule two-color fluorescence coincidence spectroscopy”. In: *Analytical chemistry* 79.7 (2007), S. 2771–2777. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac062188w.

- [94] C. Eggeling u. a. “Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection”. In: *Journal of Biotechnology* 86.3 (2001), S. 163–180. ISSN: 01681656. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00412-0.
- [95] Harry LeVine. “Thioflavine T interaction with amyloid  $\beta$ -sheet structures”. In: *Amyloid* 2.1 (1995), S. 1–6. ISSN: 1350-6129. DOI: 10.3109/13506129509031881.
- [96] Vitali I. Stsiapura u. a. “Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state”. In: *The journal of physical chemistry. A* 111.22 (2007), S. 4829–4835. ISSN: 1089-5639. DOI: 10.1021/jp070590o.
- [97] L. S. Wolfe u. a. “Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.39 (2010), S. 16863–16868. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1002867107.
- [98] Nadav Amdursky, Yuval Erez und Dan Huppert. “Molecular Rotors: What Lies Behind the High Sensitivity of the Thioflavin-T Fluorescent Marker”. In: *Accounts of Chemical Research* 45.9 (2012), S. 1548–1557. ISSN: 0001-4842. DOI: 10.1021/ar300053p.
- [99] Kirsten Gade Malmos u. a. “ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation”. In: *Amyloid* 24.1 (2017), S. 1–16. ISSN: 1350-6129. DOI: 10.1080/13506129.2017.1304905.
- [100] Krebs, M R H, Bromley, E H C und A. M. Donald. “The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications”. In: *Journal of structural biology* 149.1 (2005), S. 30–37. ISSN: 1047-8477. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.08.002.
- [101] Prabhat K. Singh, Aruna K. Mora und Sukhendu Nath. “Ultrafast fluorescence spectroscopy reveals a dominant weakly-emissive population of fibril bound thioflavin-T”. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 51.74 (2015), S. 14042–14045. DOI: 10.1039/c5cc04256a.
- [102] Christine Xue u. a. “Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation”. In: *Royal Society open science* 4.1 (2017), S. 160696. ISSN: 2054-5703. DOI: 10.1098/rsos.160696.
- [103] Samuel I. A. Cohen u. a. “From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation”. In: *Journal of Molecular Biology* 421.2-3 (2012), S. 160–171. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.02.031.
- [104] Paolo Arosio, Tuomas P. J. Knowles und Sara Linse. “On the lag phase in amyloid fibril formation”. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 17.12 (2015), S. 7606–7618. ISSN: 1463-9084. DOI: 10.1039/c4cp05563b.
- [105] Silvia de Sio u. a. “Inherent Adaptivity of Alzheimer Peptides to Crowded Environments”. In: *Macromolecular bioscience* (2023), S. 2200527. DOI: 10.1002/mabi.202200527.
- [106] G. Höhne, W. Hemminger und H.-J. Flammenheim. *Differential Scanning Calorimetry*. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1996.
- [107] C. Schick. “Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers”. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 395.6 (2009), S. 1589–1611. DOI: 10.1007/s00216-009-3169-y.
- [108] Vincent Mathot u. a. “The Flash DSC 1, a power compensation twin-type, chip-based fast scanning calorimeter (FSC): First findings on polymers”. In: *Thermochimica Acta* 522.1-2 (2011), S. 36–45. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/j.tca.2011.02.031.
- [109] Xensor Integration. *Liquid Nanocalorimeter*. URL: <https://xensor.nl/pdf/files/sheets/nanoliq-xen-39400.pdf>.

- [110] Stanley C. Gill und Peter H. von Hippel. “Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data”. In: *Analytical biochemistry* 182 (1989), S. 319–326. ISSN: 1096-0309.
- [111] Expasy. *ProtParam tool*. URL: <https://web.expasy.org/protparam/>.
- [112] Zhiping Luo. *A Practical Guide to Transmission Electron Microscopy: Fundamentals*. New York: Momentum Press, 2016.
- [113] Alan S. Cohen und Evan Calkins. “Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins”. In: *Nature* 183 (1959), S. 1202–1203.
- [114] Peter Jonathan Eaton und Paul West. *Atomic force microscopy*. Oxford und New York: Oxford University Press, 2010.
- [115] Melanie R. Nilsson. “Techniques to study amyloid fibril formation in vitro”. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 34.1 (2004), S. 151–160. ISSN: 1046-2023. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.012.
- [116] The Svedberg und Kai O. Pedersen. *The Ultracentrifuge*. Oxford: The Clarendon Press, 1940.
- [117] Peter Schuck. “Analytical Ultracentrifugation as a Tool for Studying Protein Interactions”. In: *Biophysical reviews* 5.2 (2013), S. 159–171. ISSN: 1867-2450. DOI: 10.1007/s12551-013-0106-2.
- [118] P. Schuck. “Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling”. In: *Biophysical Journal* 78.3 (2020), S. 1606–19. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76713-0.
- [119] Takami Tomiyama u. a. “A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer’s-type dementia”. In: *Annals of neurology* 63.3 (2008), S. 377–387. DOI: 10.1002/ana.21321.
- [120] Gal Bitan u. a. “Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.1 (2003), S. 330–335. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.222681699.
- [121] J. D. Harper und P. T. Lansbury. “Models of amyloid seeding in Alzheimer’s disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins”. In: *Annual Review of Biochemistry* 66.1 (1997), S. 385–407. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.66.1.385.
- [122] P. Seubert u. a. “Isolation and quantification of soluble Alzheimer’s beta-peptide from biological fluids”. In: *Nature* 359.6393 (1992), S. 325–327. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/359325a0.
- [123] L. F. Lue u. a. “Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer’s disease”. In: *The American Journal of Pathology* 155.3 (1999), S. 853–862. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65184-X.
- [124] Catriona A. McLean u. a. “Soluble pool of A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer’s disease”. In: *Annals of neurology* 46.6 (1999), S. 860–866. ISSN: 0364-5134. DOI: 10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::AID-ANA83.0.CO;2-M.
- [125] K. Garai u. a. “Quasihomogeneous nucleation of amyloid beta yields numerical bounds for the critical radius, the surface tension, and the free energy barrier for nucleus formation”. In: *Journal of Physical Chemistry* 128.4 (2008). DOI: 10.1063/1.2822322.
- [126] Angel Orte u. a. “Direct characterization of amyloidogenic oligomers by single-molecule fluorescence”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.38 (2008), S. 14424–14429. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0803086105.



- [127] Stefan Wennmalm u. a. “Highly Sensitive FRET-FCS Detects Amyloid  $\beta$ -Peptide Oligomers in Solution at Physiological Concentrations”. In: *Analytical chemistry* 87.23 (2015), S. 11700–11705. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02630.
- [128] M. K. Quinn u. a. “How fluorescent labelling alters the solution behaviour of proteins”. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17.46 (2015), S. 31177–31187. ISSN: 1463-9084. DOI: 10.1039/c5cp04463d.
- [129] Man Hoang Viet u. a. “Effect of the English familial disease mutation (H6R) on the monomers and dimers of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42”. In: *ACS Chemical Neuroscience* 5.8 (2014), S. 646–657. ISSN: 1948-7193. DOI: 10.1021/cn500007j.
- [130] Marcus Fändrich, Jessica Meinhardt und Nikolaus Grigorieff. “Structural polymorphism of Alzheimer Abeta and other amyloid fibrils”. In: *Prion* 3.2 (2009), S. 89–93. ISSN: 1933-690X. DOI: 10.4161/pri.3.2.8859.
- [131] B. P. Tseng u. a. “Deposition of monomeric, not oligomeric, Abeta mediates growth of Alzheimer’s disease amyloid plaques in human brain preparations”. In: *Biochemistry* 38.32 (1999), S. 10424–10431. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi990718v.
- [132] Jens Danielsson u. a. “Two-site binding of beta-cyclodextrin to the Alzheimer Abeta(1-40) peptide measured with combined PFG-NMR diffusion and induced chemical shifts”. In: *Biochemistry* 43.20 (2004), S. 6261–6269. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi036254p.
- [133] Tiernan T. O’Malley u. a. “The Aggregation Paths and Products of A $\beta$ 42 Dimers Are Distinct from Those of the A $\beta$ 42 Monomer”. In: *Biochemistry* 55.44 (2016), S. 6150–6161. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00453.
- [134] Hebah Fatafta u. a. “Amyloid- $\beta$  peptide dimers undergo a random coil to  $\beta$ -sheet transition in the aqueous phase but not at the neuronal membrane”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118.39 (2021), e2106210118. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.2106210118.
- [135] P. Y. Chou und G. D. Fasman. “Empirical predictions of protein conformation”. In: *Annual Review of Biochemistry* 47 (1978), S. 251–276. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.bi.47.070178.001343.
- [136] Angela D. Williams u. a. “Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis”. In: *Journal of Molecular Biology* 335.3 (2004), S. 833–842. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.11.008.
- [137] Akira Morimoto u. a. “Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (Abeta42) fibrils by systematic proline replacement”. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.50 (2004), S. 52781–52788. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M406262200.
- [138] Samuel I. A. Cohen u. a. “Distinct thermodynamic signatures of oligomer generation in the aggregation of the amyloid- $\beta$  peptide”. In: *Nature chemistry* 10.5 (2018), S. 523–531. DOI: 10.1038/s41557-018-0023-x.
- [139] S. J. Wood u. a. “Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer’s amyloid peptide Abeta”. In: *Journal of Molecular Biology* 256.5 (1996), S. 870–877. ISSN: 00222836. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0133.
- [140] Marie P. Schützmann u. a. “Endo-lysosomal A $\beta$  concentration and pH trigger formation of A $\beta$  oligomers that potently induce Tau missorting”. In: *Nature Communications* 12.4634 (2021). ISSN: 1933-690X. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24900-4>.
- [141] Mantas Ziaunys, Tomas Sneideris und Vytautas Smirnovas. “Self-inhibition of insulin amyloid-like aggregation”. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 20.43 (2018), S. 27638–27645. ISSN: 1463-9084. DOI: 10.1039/c8cp04838j.

- [142] Evan T. Powers und David L. Powers. “Mechanisms of protein fibril formation: nucleated polymerization with competing off-pathway aggregation”. In: *Biophysical journal* 94.2 (2008), S. 379–391. DOI: 10.1529/biophysj.107.117168.
- [143] Carlos Perez u. a. “Mechanism of Fibril and Soluble Oligomer Formation in Amyloid Beta and Hen Egg White Lysozyme Proteins”. In: *The journal of physical chemistry. B* 123.27 (2019), S. 5678–5689. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b02338.
- [144] Filip Hasecke u. a. “Protofibril–Fibril Interactions Inhibit Amyloid Fibril Assembly by Obstructing Secondary Nucleation”. In: *Angewandte Chemie International Edition* 60 (2021), S. 3016–3021. DOI: doi.org/10.1002/anie.202010098.
- [145] E. I. Grigorashvili u. a. “Determination of Size of Folding Nuclei of Fibrils Formed from Recombinant A $\beta$ (1-40) Peptide”. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 81.5 (2016), S. 538–547. DOI: 10.1134/S0006297916050114.
- [146] Filip Hasecke u. a. “Origin of metastable oligomers and their effects on amyloid fibril self-assembly”. In: *Chemical Science* 9.27 (2018), S. 5937–5948. DOI: 10.1039/C8SC01479E. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/sc/c8sc01479e>.
- [147] Suman Nag u. a. “Nature of the amyloid-beta monomer and the monomer-oligomer equilibrium”. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.16 (2011), S. 13827–13833. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M110.199885.
- [148] Marius Kollmer u. a. “Cryo-EM structure and polymorphism of A $\beta$  amyloid fibrils purified from Alzheimer’s brain tissue”. In: *Nature Communications* 10.1 (2019), S. 4760. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-019-12683-8. URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-12683-8>.
- [149] Ujjayini Ghosh u. a. “Molecular structure of a prevalent amyloid- $\beta$  fibril polymorph from Alzheimer’s disease brain tissue”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118.4 (2021), e2023089118. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.2023089118.
- [150] E. Levy u. a. “Mutation of the Alzheimer’s disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type”. In: *Science (New York, N.Y.)* 248.4959 (1990), S. 1124–1126. DOI: 10.1126/science.2111584.
- [151] C. Nilsberth u. a. “The ‘Arctic’ APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation”. In: *Nature neuroscience* 4.9 (2001), S. 887–893. ISSN: 1097-6256. DOI: 10.1038/nn0901-887.
- [152] Kazuma Murakami u. a. “Neurotoxicity and physicochemical properties of A $\beta$  mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer’s disease”. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.46 (2003), S. 46179–46187. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M301874200.
- [153] Alex Perálvarez-Marín u. a. “Influence of residue 22 on the folding, aggregation profile, and toxicity of the Alzheimer’s amyloid beta peptide”. In: *Biophysical journal* 97.1 (2009), S. 277–285. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.017.
- [154] Mary Griffin Krone u. a. “Effects of familial Alzheimer’s disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein”. In: *Journal of Molecular Biology* 381.1 (2008), S. 221–228. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.05.069.
- [155] Torleif Härd und Christofer Lendel. “Inhibition of amyloid formation”. In: *Journal of Molecular Biology* 421.4-5 (2012), S. 441–465. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.12.062.
- [156] Mireia Seuma u. a. “The genetic landscape for amyloid beta fibril nucleation accurately discriminates familial Alzheimer’s disease mutations”. In: *eLife* 10 (2021). DOI: 10.7554/eLife.63364. URL: <https://elifesciences.org/articles/63364>.

- [157] Subramanian Vivekanandan u. a. “A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment”. In: *Biochemical and biophysical research communications* 411.2 (2011), S. 312–316. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.133.
- [158] Kramers HA. “Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions”. In: *Physica* 7 (1940), S. 284.
- [159] Alexander J. Dear u. a. “The catalytic nature of protein aggregation”. In: *Journal of Physical Chemistry* 152.4 (2020), S. 045101. DOI: 10.1063/1.5133635.
- [160] Yiling Xiao u. a. “A $\beta$ (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer’s disease”. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 22.6 (2015), S. 499–505. ISSN: 1545-9985. DOI: 10.1038/nsmb.2991. URL: <https://www.nature.com/articles/nsmb.2991>.
- [161] Bogdan Barz, Alexander K. Buell und Soumay Nath. “Compact fibril-like structure of amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) monomers”. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 57.7 (2021), S. 947–950. DOI: 10.1039/D0CC06607A. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/cc/d0cc06607a>.
- [162] J. M. Sturtevant. “Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry”. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 38.1 (1987), S. 463–488. ISSN: 0066-426X. DOI: 10.1146/annurev.pc.38.100187.002335.
- [163] Christopher M. Johnson. “Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability”. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 531.1-2 (2013), S. 100–109. DOI: 10.1016/j.abb.2012.09.008.
- [164] J. F. Brandts und L. N. Lin. “Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry”. In: *Biochemistry* 29.29 (1990), S. 6927–6940. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00481a024.
- [165] C.A Cerdeiriña u. a. “Highly precise determination of the heat capacity of liquids by DSC: calibration and measurement”. In: *Thermochimica Acta* 347.1-2 (2000), S. 37–44. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/S0040-6031(99)00414-1.
- [166] Christoph Schick und Vincent Mathot, Hrsg. *Fast scanning calorimetry*. Cham: Springer, 2016. ISBN: 9783319313276.
- [167] Peggy Cebe u. a. “Beating the heat—fast scanning melts silk beta sheet crystals”. In: *Scientific reports* 3 (2013), S. 1130. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep01130.
- [168] W. Pfeil und P. L. Privalov. “Thermodynamic investigations of proteins”. In: *Biophysical Chemistry* 4.1 (1976), S. 41–50. ISSN: 03014622. DOI: 10.1016/0301-4622(76)80005-1.
- [169] Patrizia Kruse. “Flash DSC Untersuchungen am Lysozym”. Bachelorarbeit. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2016.
- [170] Esther Schevel. “Untersuchung den thermischen Stabilität des A $\beta$ -Peptids und dessen Aggregate am Flash-DSC”. Bachelorarbeit. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2017.
- [171] J. Schawe. “Probenpräparation und Kurvenaufbereitung beim Messen von Polymeren”. In: *Mettler Toledo Thermal Analysis User Com.* Bd. 36. 2012, S. 17–24.
- [172] G. I. Makhatadze. “Measuring protein thermostability by differential scanning calorimetry”. In: *Current protocols in protein science* Chapter 7 (2001), Unit 7.9. DOI: 10.1002/0471140864.ps0709s12.
- [173] Akihiko Toda und Misuzu Konishi. “An evaluation of thermal lags of fast-scan microchip DSC with polymer film samples”. In: *Thermochimica Acta* 589 (2014), S. 262–269. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/j.tca.2014.05.038.

- [174] Huanhuan Gao u. a. “Combining fast-scan chip-calorimeter with molecular simulations to investigate superheating behaviors of lamellar polymer crystals”. In: *Polymer* 55.16 (2014), S. 4307–4312. ISSN: 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2014.06.048.
- [175] K.-H. Illers. “Die ermittlung des schmelzpunktes von kristallinen polymeren mittels wärme-flusskalorimetrie (DSC)”. In: *European Polymer Journal* 10.10 (1974), S. 911–916. ISSN: 00143057. DOI: 10.1016/0014-3057(74)90027-5.
- [176] A. A. Minakov, A. Wurm und C. Schick. “Superheating in linear polymers studied by ultrafast nanocalorimetry”. In: *The European physical journal. E, Soft matter* 23.1 (2007), S. 43–53. ISSN: 1292-8941. DOI: 10.1140/epje/i2007-10173-8.
- [177] Salvador Casares u. a. “Detection and Characterization of Partially Unfolded Oligomers of the SH3 Domain of  $\alpha$ -Spectrin”. In: *Biophysical journal* 86.4 (2004), S. 2403–2413. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74297-6.
- [178] Bruno Voigt, Maria Ott und Jochen Balbach. “A Competition of Secondary and Primary Nucleation Controls Amyloid Fibril Formation of the Parathyroid Hormone”. In: *Macromolecular bioscience* 23.4 (2023), e2200525. DOI: 10.1002/mabi.202200525.
- [179] Tobias Kaffka. “Einfluss kovalent gebundener Fluorophore auf Aggregation und Fibrillierung des humanen Parathormons”. Masterarbeit. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2.03.2020.
- [180] Martin Muschol und Wolfgang Hoyer. “Amyloid oligomers as on-pathway precursors or off-pathway competitors of fibrils”. In: *Frontiers in Molecular Biosciences* 10 (2023), S. 1120416. ISSN: 2296-889X. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1120416.
- [181] Martin Fränzl u. a. “Thermophoretic trap for single amyloid fibril and protein aggregation studies”. In: *Nature Methods* 16 (2019), S. 611–614. DOI: 10.1038/s41592-019-0451-6.
- [182] S. Broersma. “Viscous force and torque constants for a cylinder”. In: *Journal of Physical Chemistry* 74 (1981), S. 6989. DOI: 10.1063/1.441071.

# A. Ergänzung: Einfluss von Fluorophoren auf die Bildung von Oligomeren

## A.1. ThT Assays an markierten A $\beta$ 40 Peptiden

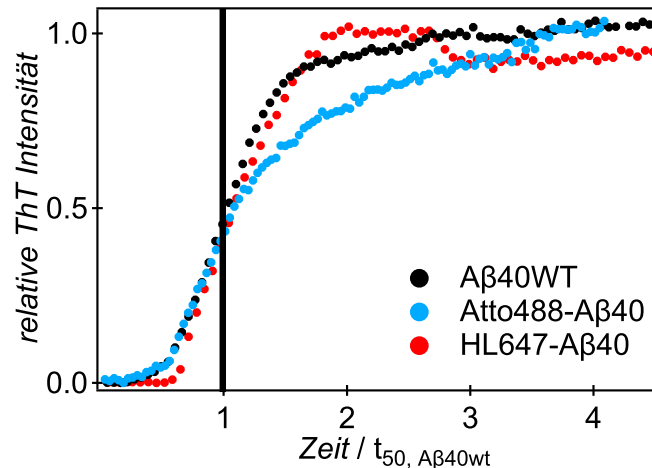


Abbildung A.1.: **Normierte ThT Assays an gelabeltem A $\beta$ 40** ThT Assays an A $\beta$ 40WT, Atto488-A $\beta$ 40 und HL647-A $\beta$ 40 wurden auf die Halbzeit von A $\beta$ 40WT normiert, die dadurch bei einem Wert von eins liegt (schwarz eingezeichnete vertikale Linie). Deutlich sichtbar wird, dass dies auch in etwa der Halbzeit von Atto488-A $\beta$ 40 und HL647-A $\beta$ 40 entspricht. Auch insgesamt gleichen sich die Verläufe der ThT Assays. Die in Kapitel 4 gezeigten unterschiedlichen Größenverteilungen der Oligomere sind damit nicht darauf zurückzuführen, dass die Markierung mit einem der beiden Fluorophore zu einer verlangsamteten oder beschleunigten Aggregationskinetik führt. Die Abbildung wurde adaptiert von [71].

## A.2. Ergänzende TEM-Aufnahmen

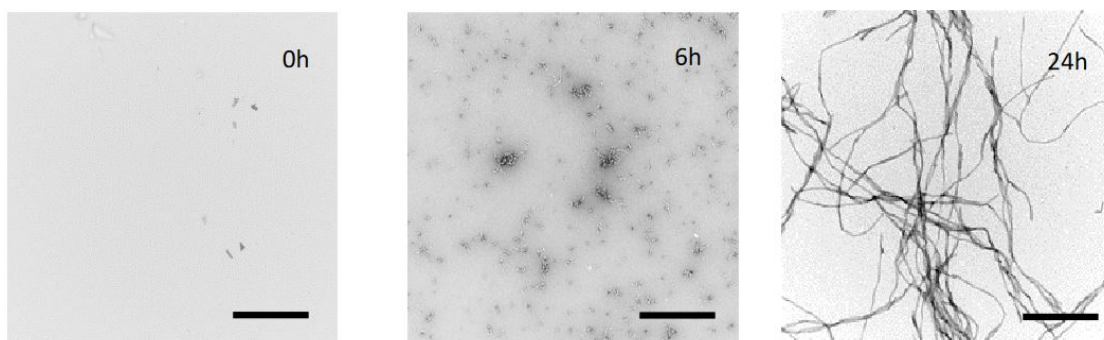


Abbildung A.2.: **TEM-Aufnahmen nach 0 h, 6 h und 24 h** Nach 6 h Aggregation konnten in TEM-Aufnahmen von A $\beta$ 40WT noch keine Fibrillen nachgewiesen werden, dafür aber Oligomere, die vor Beginn der Aggregation noch nicht vorhanden sind. Die eingezeichneten Skalenbalken entsprechen 500 nm. Die Abbildung wurde übernommen aus [71].

### A.3. Größenverteilung der A $\beta$ 42-Oligomere

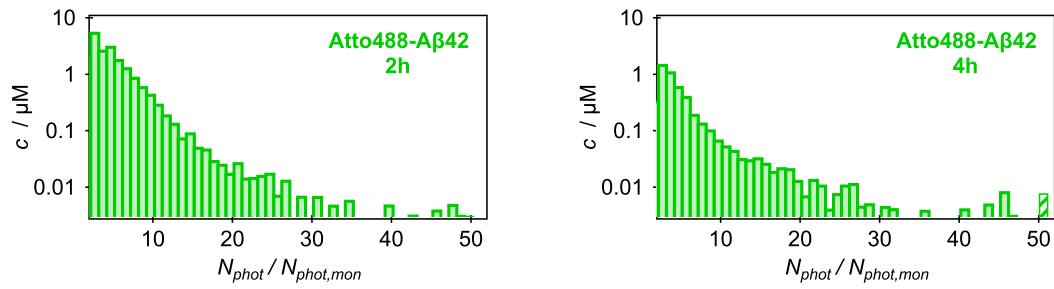


Abbildung A.3.: **Größenverteilungen der A $\beta$ 42-Oligomere nach 2 h und nach 4 h** Während der Inkubation des A $\beta$ 42-Peptids verändern sich die Größenverteilungen der Oligomere zwischen 2 h und 4 h nur marginal, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in diesem Zeitraum ein metastabiles Gleichgewicht besteht.

# B. Ergänzung: Aggregationskinetik von Aβ40 und Aβ42

## B.1. Bildung von gemittelten ThT Assays bei stark unterschiedlichen Lagzeiten

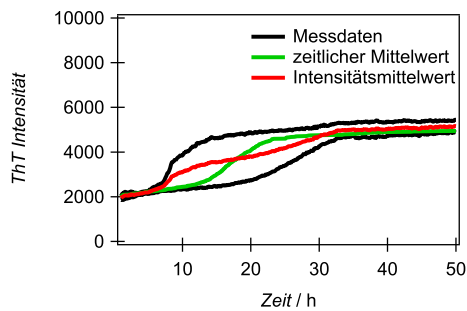


Abbildung B.1.: Vergleich der zeitlichen Mittelung mit der Mittelung über Intensitäten Die beiden experimentell an Aβ42 (nach dem pH9-Protokoll präpariert und bei 37°C inkubiert) gemessenen ThT Assays zeigen deutlich verschiedene Lagzeiten. Bei einer Mittelung über die Intensitäten (rot) wird dadurch eine zusätzliche Stufe während der Wachstumsphase induziert, die nicht dem experimentellen Ergebnis entspricht. In solchen Fällen eignet sich eine Mittelung besser, bei der die Zeitpunkte gemittelt werden, zu denen eine bestimmte Intensität erreicht wurde (grün).

## B.2. Posterpräsentation inklusive Inhibitionseffekt

B12

### Early mechanism of amyloid formation and the influence of macromolecular crowding

Jana Wägele, Silvia De Sio, Twinkle Bhatia, Maria Ott  
Institute of Biochemistry and Biotechnology, MLU

#### Idea and Scientific Question

This project aims to gain a more detailed understanding of the early prefibrillar growth process and the influence of a confining environment. Early oligomeric states display fundamental properties of amyloid peptides and reveal their mechanisms of aggregation. Insight into the early stages of aggregation will help to test and modify current modes of nucleation and growth, and to investigate fundamental differences between functional amyloids (e.g. PTH) and disease related amyloids (e.g. Aβ).

In order to reveal the initial pathways of aggregation and disassembly, size distributions of small transient oligomers are experimentally studied along the time course of fibrillation. Starting with the disease relevant amyloid peptides of Aβ in the last funding period, we want to expand our investigations to the functional amyloid PTH and to compare it with Aβ.

Once amyloid aggregation takes place in complex environments, spatial confinement and interactions with other materials may modify the process of aggregation. The molecular mechanism behind the induced accelerated or retarded growth is fundamental, but not yet understood. We will use macromolecular crowding to reveal the impact of an outer confinement and to discuss the importance of intermolecular interactions and to test current modes of nucleation and growth. Distinct and differences between the functional amyloid PTH and the disease related amyloid Aβ will be addressed.

#### Results

##### Fibrillation kinetics of Aβ40 variants

Normalized ThT concentration versus time averaged over at least 5 different measurements.

Concentration dependence of the half time of fibrillation can reveal the mechanism of aggregation.

NEW Global fitting alternative to reveal rates of primary and secondary nucleation.

$$\Delta F(t) = \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right) \left(1 - e^{-\alpha k_p [M]_0 t}\right) \Delta F_{max}$$

primary nucleation:  $k = k_1 k_{nuc} [M]_0^{n-1} e^{-k_{off} t}$   
 secondary nucleation:  $k = k_2 k_{nuc} [M]_0^{n-1} e^{-k_{off} t}$   
 for  $k_1/k_2 = 0.337$  @ 37°C,  $n = 3$ ,  $k_{off} = 0.002$ ,  $k_{nuc} = 0.001$

#### Results

##### Fibrillation of Aβ40/Aβ42 with polymer crowders

ThT Assays measured at 37°C by shaking. To display the time course of Aβ40/Aβ42 fibrillation (without shaking) and with crowders (PEG) we will study an amyloid under confinement (e.g. PEG) and under crowding (e.g. PEG) in 0.01 M NaCl with respect to the possible role of  $\Delta F$  in the volume fraction at which the individual polymer coils start to contact. Thus the limit of dilute to semi-dilute regime.

Fibrillation efficiency

Fibrillation kinetics

#### Results

##### Transient aggregates of PTH84 via homo-crowding

Fluorescence Correlation Spectroscopy

Fluor Resonance Energy Transfer

Molecular Dynamics

#### Work Packages and Methods

WP1: Nucleation and Growth of Aβ

WP2: Nucleation and Growth of PTH

WP3: Impact of Polymer crowding

WP4: Impact of Protein crowding

Comparison of the induced changes for Aβ and PTH oligomers

#### Results

##### Differential equations of the early aggregation

Competition of unimolecular aggregation:  $\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M] - k_2[M]^2 + k_{off}[M]$

Competition of unimolecular aggregation and nucleation:  $\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M] - k_2[M]^2 + k_{off}[M] + k_{nuc}[M]^{n-1}$

Competition of unimolecular aggregation, nucleation and secondary nucleation:  $\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M] - k_2[M]^2 + k_{off}[M] + k_{nuc}[M]^{n-1} + k_{sn}[M]^{n-1}$

Competition of unimolecular aggregation, nucleation, secondary nucleation and growth:  $\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M] - k_2[M]^2 + k_{off}[M] + k_{nuc}[M]^{n-1} + k_{sn}[M]^{n-1} - k_p[M]$

Solution:  $M(t) = \frac{M_0}{1 + k_1 t + k_2 M_0 t^2 + \dots}$

Full time predictions of the fibrillar mass (M):

Microscopic processes

SFB/TRR 102 Polymers under multiple constraints: restricted and controlled molecular order and mobility

Abbildung B.2.: Poster für den Miniworkshop des SFB / TRR 102 am 23.10.2020 In der mittleren Spalte werden bereits die auch in dieser Arbeit gezeigten Abhängigkeiten der Halbzzeit von der Halbzzeit dargestellt.

### B.3. Beispiele für die Fibrillierungskinetik der A $\beta$ 40-Varianten im Ensemble

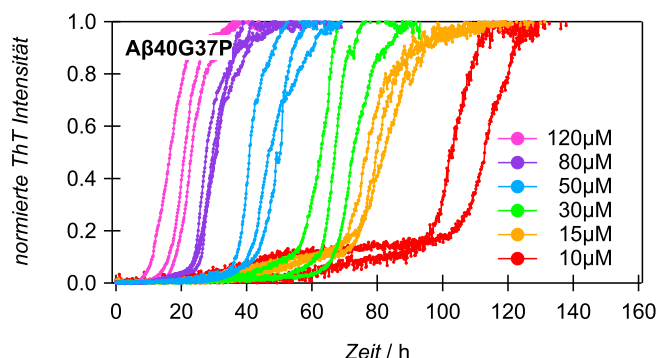


Abbildung B.3.: **Konzentrationsabhängigkeit der Aggregationskinetik von A $\beta$ G37P bei 37°C**  
 Gezeigt werden jeweils 3 repräsentative ThT Assays je Konzentration. Der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle gemessenen Konzentrationen dargestellt. Bei den beiden geringsten Konzentration ist eine Stufe innerhalb der Lagzeit sichtbar. Für den Wildtyp von A $\beta$ 40 wurde in der Literatur von ThT Assays mit zwei Anstiegen bei erhöhten (!) Konzentrationen berichtet; der erste Anstieg wurde dabei der Bildung von Mizellen zugeordnet, der zweite einer anschließenden Fibrillenbildung [180]. Da bei 10  $\mu$ M nicht alle gemessenen A $\beta$ 40G37P-Proben Fibrillen bildeten, wurde diese Konzentration bei der globalen Funktionsanpassung in Kapitel 5 nicht einbezogen. Bei 15  $\mu$ M wurde für die globale Analyse nur der größere Anstieg während der Wachstumsphase berücksichtigt. Da für diese Variante insgesamt zehn Konzentrationen für die globale Funktionsanpassung berücksichtigt wurden, sollte ein daraus eventuell resultierender Fehler nur gering sein.

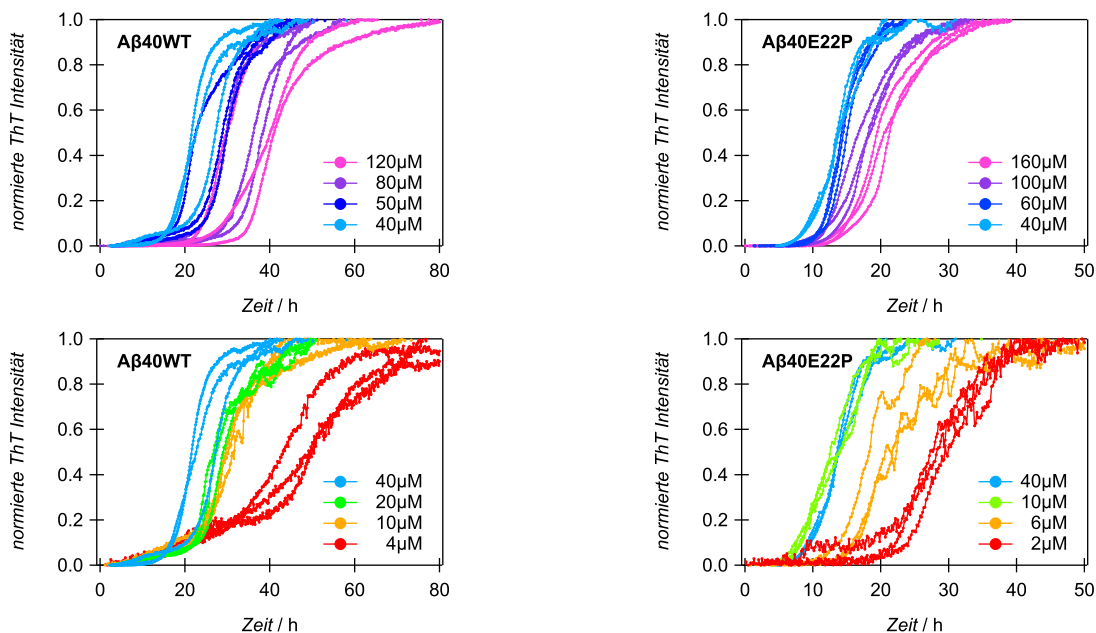


Abbildung B.4.: **Konzentrationsabhängige Aggregationskinetik von A $\beta$ WT und A $\beta$ E22P bei 37°C**  
 Gezeigt werden jeweils 3 repräsentative ThT Assays je Konzentration. Für eine bessere Übersichtlichkeit der Darstellung sind nicht alle gemessenen Konzentrationen abgebildet. Im Gegensatz zu A $\beta$ G37P ist hier nicht über den gesamten Aggregationsbereich eine Abnahme der Aggregationszeit mit zunehmender Konzentration zu beobachten, sondern kann im Gegenteil bei hohen Konzentrationen eine Verlangsamung des Aggregationsprozesses festgestellt werden.



## B.4. Konzentrationsabhängigkeit makroskopischer Zeitgrößen

Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit  $t_{lag}$

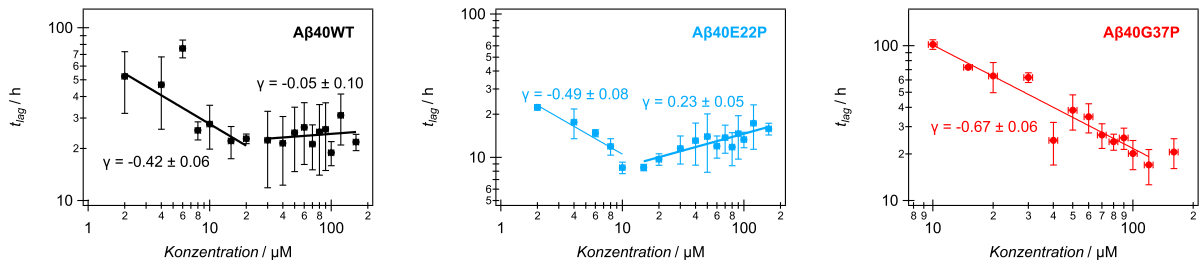


Abbildung B.5.: Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit von A $\beta_{40}$ -Varianten bei  $37^\circ\text{C}$

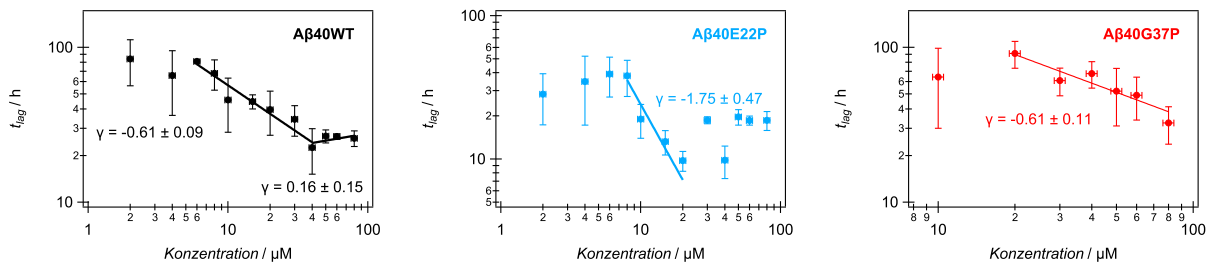


Abbildung B.6.: Konzentrationsabhängigkeit der Lagzeit von A $\beta_{40}$ -Varianten bei Raumtemperatur

Konzentrationsabhängigkeit von  $T_2$  und  $L_{rel}$

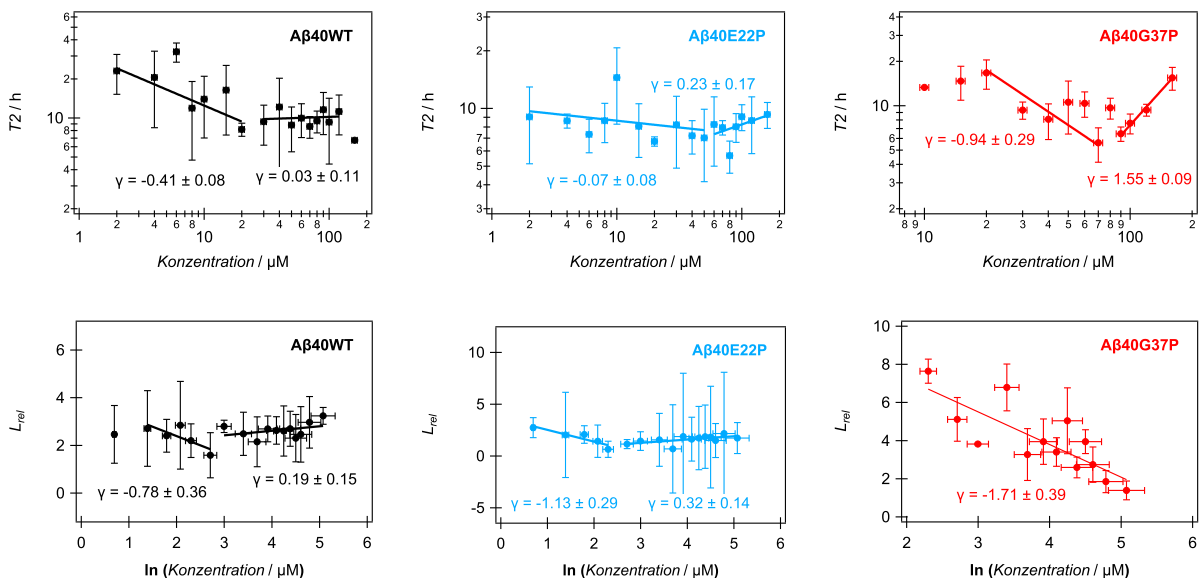


Abbildung B.7.: Konzentrationsabhängigkeit von  $T_2$  und  $L_{rel}$  für A $\beta_{40}$ -Varianten bei  $37^\circ\text{C}$

ANHANG B. ERGÄNZUNG: AGGREGATIONSKINETIK VON A $\beta$ 40 UND A $\beta$ 42

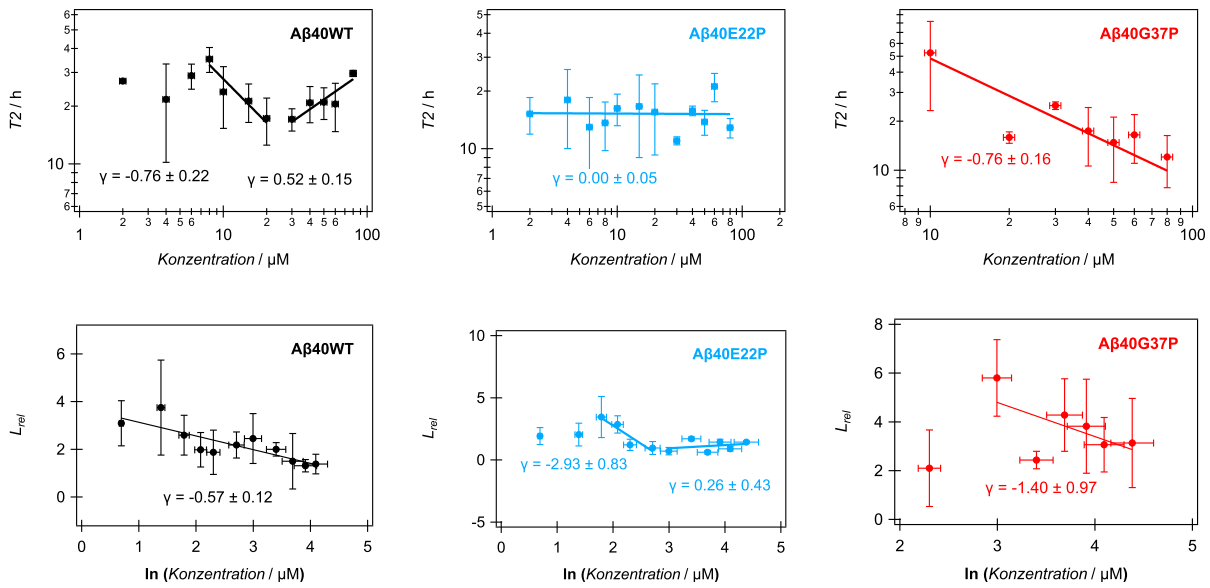


Abbildung B.8.: Konzentrationsabhängigkeit von  $T_2$  und  $L_{rel}$  für A $\beta$ 40-Varianten bei Raumtemperatur

B.5. Plateauintensitäten der A $\beta$ 40-Varianten im Vergleich

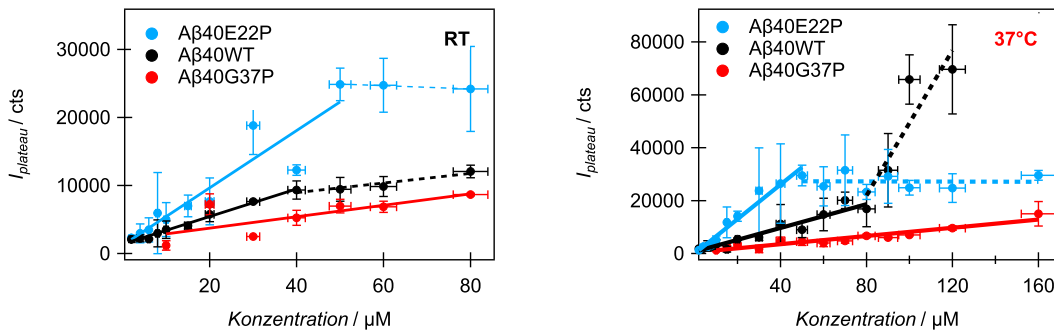


Abbildung B.9.: Konzentrationsabhängige Plateauwerte der A $\beta$ 40-Varianten Einzig die Variante A $\beta$ 40G37P zeigt über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich die gleiche Proportionalität zwischen ThT Intensität in der Plateauphase und Konzentration. Die beiden anderen Varianten, die bei hohen Konzentrationen Sättigungs- und Inhibitionseffekte zeigen, zeigen auch einen Übergang zu einer veränderten Abhängigkeit der Plateauintensität. Über den gesamten Konzentrationsbereich sind die Plateauintensitäten für A $\beta$ 40G37P am niedrigsten, für A $\beta$ 40E22P außer bei Konzentrationen oberhalb von 80  $\mu\text{M}$  bei 37 °C am höchsten. Die A $\beta$ 40-Variante mit den geringsten Halbzzeiten weist damit die höchsten Plateauwerte auf und vice versa.

## B.6. ThT Assays an A $\beta$ 42E22P

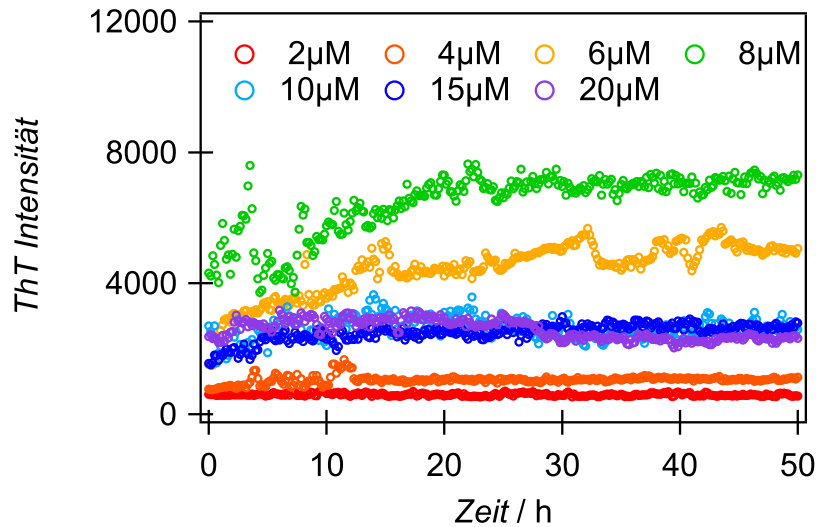


Abbildung B.10.: **Konzentrationsabhängige ThT Assays an A $\beta$ 42E22P** Bereits zum Startpunkt der Messung haben die ThT Assays an A $\beta$ 42E22P die Plateauphase fast erreicht, sodass hier keine sinnvolle Auswertung möglich ist. Bis zu einer Konzentration von 8  $\mu$ M steigt der Intensitätswert der Plateauphase mit zunehmender Konzentration an, danach fällt er auf etwa 2500 cts ab und zeigt keine Konzentrationsabhängigkeit mehr. Die A $\beta$ 42E22P-Proben wurden nach dem *pH13-Protokoll* präpariert und ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Darstellt sind über jeweils drei Messungen gemittelte ThT Assays.

## B.7. Bestimmung der Elongationsrate mithilfe einer Thermophoretischen Falle

### B.7.1. Analyse des Fibrillenwachstums in der Thermophoretischen Falle

Um die Elongationsrate von Amyloidfibrillen zu bestimmen, wurde eine von der Cichos-Fachgruppe des Peter-Debye-Institut für Physik der Weichen Materie, Universität Leipzig, selbstgebaute Thermophoretische Falle eingesetzt, die eine in-situ Beobachtung fibrillären Wachstums einzelner Fibrillen über einen Zeitraum von mehreren Minuten bis hin zu Stunden ermöglicht. Sie beruht auf der thermodynamischen Driftbewegung  $v_T$  von Makromolekülen mit dem thermodynamischen Diffusionskoeffizienten  $D_T$ , gegeben durch

$$v_T = -D_T \nabla T \quad (\text{B.1})$$

wenn sie einem Temperaturgradienten  $\nabla T$  ausgesetzt sind. [181]

Für die Messungen werden die Fibrillenlösungen auf ein mit einem Chromfilm überzogenes Deckglas gegeben, wobei der Chromfilm Löcher mit einem Durchmesser von 10  $\mu$ m besitzt. Ein mit 100 Hz entlang der Löcher rotierender Laser mit einer Wellenlänge von 808 nm realisiert durch das Aufheizen des Chroms die thermophoretische Falle. Ausgehend vom Rand der Chromlöcher sinkt die Temperatur der Lösung graduell ab bis zu einem Minimum in der Mitte, da das Deckglas selbst weniger Wärme leitet als der Chromfilm. Damit können einzelne Fibrillen „gefangen“ werden. [181] Um die Fibrillen optisch sichtbar zu machen, werden die Fibrillenlösungen mit 20  $\mu$ M Thioflavin T versetzt (für Details zur Fluoreszenz von Thioflavin T in Gegenwart von Amyloidfibrillen s. Kap. 3.4.1). Eine Kamera zeichnet ihre Bewegung in der Thermophoretischen Falle mit einer Bildrate von 33  $\text{s}^{-1}$  auf. Auf jedem Bild kann die Position des Masseschwerpunkts und die Orientierung der Fibrille innerhalb der zum Deckglas parallelen Ebene bestimmt werden. Aus den Änderung

dieser beiden Größen zwischen den einzelnen Bildern ergeben sich dann die zweidimensionalen Translations- und Rotationsdiffusionskoeffizienten  $D_{trans}$  und  $D_{rot}$  der Fibrillen. [181]

Bei theoretischer Näherung der Fibrillen als starre Zylinder, hängen die Diffusionskoeffizienten über

$$D_{trans} = \frac{1}{2}D_{trans}^{\parallel} + \frac{1}{2}D_{trans}^{\perp} = \frac{k_B T (3 \ln(L/d) + 2\gamma_{\parallel} + \gamma_{\perp})}{8\pi\eta L} \quad (\text{B.2a})$$

$$D_{rot} = \frac{k_B T (3 \ln(L/d) + \gamma_r)}{8\pi\eta L} \quad (\text{B.2b})$$

mit der Fibrillenlänge  $L$  zusammen. Dabei sei  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $\eta$  die Viskosität des Lösungsmittel und  $d$  der Fibrillendurchmesser. Unter der Näherung  $L/d \rightarrow \infty$  gilt weiterhin für die Koeffizienten  $\gamma$  [182]:

- $\gamma_{\parallel} = -0.114$
- $\gamma_{\perp} = 0.886$
- $\gamma_r = -0.447$

Dass Amyloidfibrillen nur wenige Nanometer Durchmesser haben, aber eine Länge in der Größenordnung von Mikrometern erreichen, rechtfertigt diese Näherung. Bei einem längeren Beobachtungszeitraum von Fibrillen in Gegenwart von Monomeren kann nun zu unterschiedlichen Zeiten die Fibrillenlänge bestimmt und daraus direkt die Elongationsrate für eine einzelne Fibrille abgeschätzt werden. [181]

### B.7.2. Probenpräparation für die Thermophoretische Falle

Für die Bestimmung der Elongationsrate in der Thermophoretischen Falle wurden Lösungen aller A $\beta$ -Varianten nach dem *pH13-Protokoll* hergestellt, die 60 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert wurden, um Fibrillen zu erhalten. Die initiale Monomerkonzentration betrug dabei jeweils 10  $\mu\text{M}$  mit Ausnahme der A $\beta$ 40G37P-Lösung: Da diese A $\beta$ -Variante bei 10  $\mu\text{M}$  nicht zuverlässig fibrilliert und über einen weiten Konzentrationsbereich keine die Fibrillierung verlangsamenen Effekte zeigt, wie sie für einige der anderen Varianten bei hohen Konzentrationen auftreten (vgl. Kap. 5), wurde hier mit 80  $\mu\text{M}$  gearbeitet. Bis zum Gebrauch wurden diese Lösungen eingefroren.

Unmittelbar vor Beginn der Messungen wurden, ebenfalls nach dem *pH13-Protokoll*, Monomertlösungen gleicher Konzentration hergestellt, die sofort verwendet wurden, um möglichst frei von Aggregaten zu sein. Die finalen Lösungen für die Messungen bestanden dann aus

- 45.5  $\mu\text{l}$  Monomertlösung
- 2.5  $\mu\text{l}$  Fibrillenlösung
- 1  $\mu\text{l}$  einer 1 mM ThT-Stammlösung
- 1  $\mu\text{l}$  einer 5 wt% Pluronic F-127 Lösung mit pH 7.4

Das Pluronic wird dabei hinzugegeben, weil die Fibrillen dazu neigen, an der Glasoberfläche der verwendeten Deckgläser bzw. aneinander zu haften, für die Messungen jedoch möglichst isoliert in Lösung benötigt werden.

### B.7.3. Resultate für A $\beta$ -Varianten

In der Thermophoretischen Falle wurden die in Abb. B.7 dargestellten Wachstumsgeschwindigkeiten der Fibrillen gemessen.

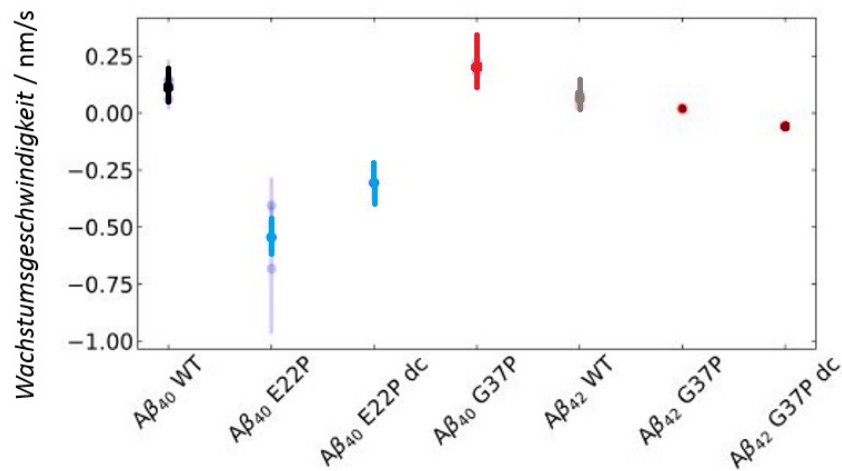


Abbildung B.11.: **Wachstumsgeschwindigkeiten der Fibrillen von A $\beta$ <sub>40</sub>- und A $\beta$ <sub>42</sub>-Varianten** Die Abbildung wurde aus dem Poster *Growth of different A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> variants in a thermophoretic trap* von B. Faselow et al. (2020) übernommen und adaptiert. Das Kürzel *dc* bei den Probenamen steht für *double concentration*, d.h. es wurden 20  $\mu$ M A $\beta$ <sub>40</sub>E22P bzw. A $\beta$ <sub>42</sub>G37P verwendet.

Für A $\beta$ <sub>40</sub>WT ergaben sich  $\sim 0.11$  nm/s, was vergleichbar ist mit den von Fränzl *et al.* veröffentlichten Ergebnissen [181]. Für A $\beta$ <sub>40</sub>G37P wurden etwa 0.20 nm/s gemessen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten von A $\beta$ <sub>42</sub>WT und A $\beta$ <sub>42</sub>G37P waren mit  $\sim 0.06$  nm/s bzw.  $\sim 0.02$  nm/s langsamer als die für A $\beta$ <sub>40</sub> gemessenen. Einen Sonderfall stellt A $\beta$ <sub>40</sub>E22P dar: Hier schrumpften die Fibrillen mit  $-0.31$  nm/s bis  $[-0.55]$ nm/s.



## C. Angaben zu verwendeter Software zur Erstellung von Abbildungen

Für die Erstellung von Abbildungen wurde in dieser Arbeit insbesondere folgende Software verwendet:

- *Igor Pro* von *Wave Metrics*, *Version 6-8*:  
für die Programmierung von Analyseroutinen, die Analyse von smFS-Daten und ThT Assays sowie die Erstellung datenbasierter Abbildungen
- *Microsoft Power Point 2007* und *Microsoft Paint*:  
für die Erstellung illustrativer Abbildungen sowie aus anderen Veröffentlichungen adaptierten Abbildungen
- *ImageJ* und *GIMP* zur Erhöhung des Kontrasts in TEM-Aufnahmen und für das Einfärben der Strukturformeln von Fluorophoren





## D. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Maria Ott bedanke ich mich für die Betreuung, die zahlreichen Diskussionen, Tipps und Hilfestellungen für Analysen, und das große Verständnis für die Herausforderung, Doktorarbeit und kleine Kinder zu vereinbaren - insbesondere während der Corona-Zeit. Thomas Thurn-Albrecht danke ich für das große Interesse, die wertvollen Hinweise und besonders dafür, stets zur richtigen Zeit die richtigen motivierenden Worte parat zu haben.

Silvia De Sio danke ich für die Aufnahme von smFS-Messungen während meiner ersten Babypause, die ich hier mit benutzen durfte, für intensive fachliche und schöne nicht-fachliche Gespräche und das gemeinsame Erproben von Frustrationstoleranz bei der Justage des Fluoreszenzmikroskop-Aufbaus. Auch Twinkle Bathia danke ich für ergänzende Fluoreszenzspektroskopie-Messungen. Ich hatte das große Glück, zwei wunderbare Bachelorstudentinnen mitbetreuen zu können, und bedanke mich bei Patrizia Kruse und Esther Schevel für ihre Arbeit am Flash DSC. Bei Hauke Lillie möchte ich mich bedanken für die AUZ-Messungen und ihre Auswertung, die großartigen Hinweise und dass er sich immer wieder Zeit genommen hat, sich meine Ergebnisse anzuhören. Mein Dank für die Einführung in Konzentrationsbestimmungen, ThT Assays und die Präparation von TEM-Proben geht an Monika Baumann; bei ihr und Bruno Voigt bedanke ich mich außerdem für das Anfertigen von TEM-Aufnahmen. Benjamin Fanselow danke ich für die Messungen in der Thermophoretischen Falle. Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Luca Lauth, Ann-Kristin Fliieger, Theresa Simon, Bruno Voigt und Ulrich Weininger sowie meiner Familie.

Ich konnte meine Doktorarbeit im Rahmen des SFB/TRR 102 anfertigen und habe dort stets die freundliche Atmosphäre, das gegenseitige Interesse und die zugewandten Diskussionen genossen. Außerdem konnte ich zahlreiche Weiterbildungen besuchen, die von Thomas Michael und Ann-Kristin Fliieger organisiert wurden. Mein herzlicher Dank dafür. Das freundschaftliche Miteinander in der Polymerphysik-Arbeitsgruppe war ein Highlight - die gemeinsame Kaffeerrunde nach dem Mittagessen hat mich über manche wissenschaftliche Durststrecke gerettet. Auch nach dem Umzug in die Proteinbiochemie durfte ich weiter eine kollegiale Atmosphäre im Büro erfahren.

Ohne Unterstützung bei der Kinderbetreuung hätte ich diese Arbeit nie einreichen können: Susanne, ohne Dich hätte ich zu Lockdown-Zeiten noch weniger geschafft! Mein großer Dank geht an meine ganze Familie - insbesondere meine Eltern - für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Mein Mann war außerdem mein erster Ansprechpartner, wenn irgendeine Software nicht so funktioniert hat, wie sie sollte. Ein riesengroßer Dank geht auch an meine beiden kleinen Töchter, dafür, dass sie mich immer wieder an den Computer gelassen haben, auch wenn es ihnen so schwer fiel: Ihr seid das Wunderbarste, was es gibt in meinem Leben.



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jana Wägele, die vorliegende Arbeit *Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Peptids: Einfluss von Fluorophoren, Aggregationskinetik und Thermostabilität der Aggregate* selbstständig verfasst und verwendete Literatur und Hilfsmittel angegeben zu haben. Wörtlich oder inhaltlich aus Publikationen übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass von mir noch keine anderen Promotionsversuche unternommen wurden und die vorliegende Arbeit noch nicht dieser oder einer anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Lüneburg, den 02. Juni 2023

Jana Wägele